

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

SUR LA PRÉSENCE SIMULTANÉE
DE DEUX TYPES BACTÉRIOPHAGIQUES (D₁ ET D₆)
DANS UNE CULTURE DE *Salmonella typhi*

par ANDRÉ JUDE, PIERRE NICOLLE et PAUL DUCREST (*).

(*Laboratoire central de Bactériologie de l'Armée
et Institut Pasteur. Service du Bactériophage.*)

RÉACTIONS ANORMALES D'UNE CULTURE DE *Salmonella typhi*
AUX BACTÉRIOPHAGES DE LA LYSOTYPIE (1).

Le groupe des types D de *S. typhi* déterminés par la lysotypie, suivant la méthode de Craigie et Felix, 1947 [1], comprend les sous-types D₁, D₂, D₄ (le D₃ a été supprimé), D₅ et D₆. Le sous-type D₁ est caractérisé dans les conditions de notre expérimentation (Jude et Nicolle, 1949 [2], Nicolle et Jude, 1951 [3]), par l'obtention d'une lyse confluente avec les phages Vi D₁, D₂, D₄ et D₅ et d'une lyse partielle (plages plus ou moins nombreuses, mais rarement confluentes) avec le phage Vi D₆ (fig. 1 a). Les sous-types D₂, D₄ et D₆ ne subissent la lyse qu'avec leur phage Vi homologue (fig. 1 b). Le sous-type D₅ enfin est lysé par les phages Vi D₅ et D₆, à l'exclusion des autres (tableau I,

(*) Société française de Microbiologie, séance du 10 mai 1951.

(1) La lysotypie est le terme par lequel nous traduisons en français l'expression « phage typing », c'est-à-dire la détermination des types d'une espèce bactérienne par les bactériophages (NICOLLE, JUDE et BUTTIAX, 1950).

schéma 1). Les réactions des types D aux phages Vi spécifiques sont parmi les plus nettes et les plus faciles à interpréter de la méthode.

En septembre 1950, le Centre de lysotypie de l'Institut Pasteur a reçu d'un laboratoire d'outre-mer une culture de *S. typhi*.

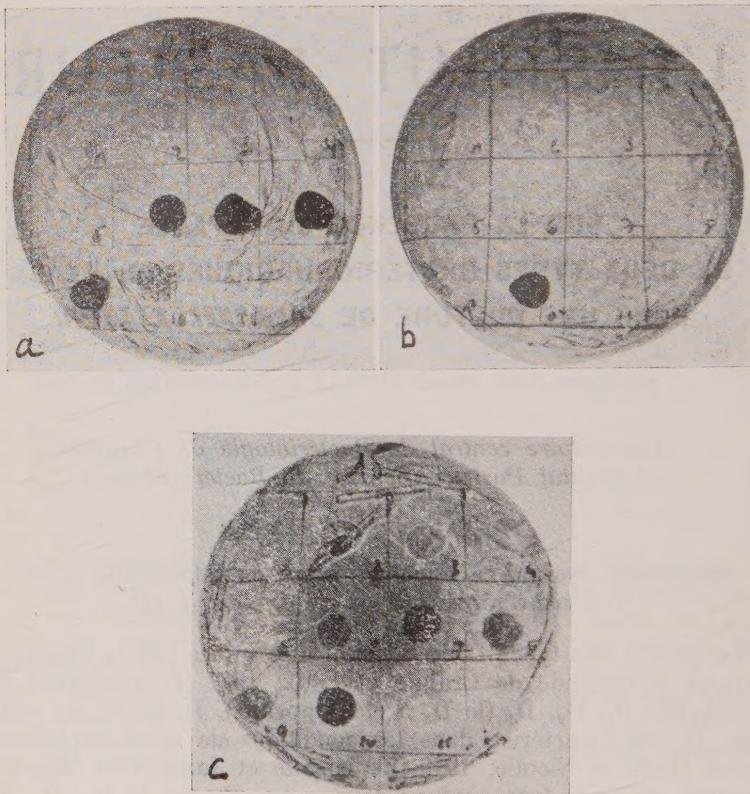


FIG. 1. — Lysotypie de la culture Dak. 3. *a*, subculture d'une colonie D_1 ; *b*, subculture d'une colonie D_6 ; *c*, culture originelle.

(Dak. 3), appartenant au type fermentatif I de Kristensen, 1938 [4], c'est-à-dire attaquant le xylose et non l'arabinose, qui manifestement faisait partie du groupe des types bactériophagiques D, mais par exception, ne pouvait être classée parmi l'un des sous-types de ce groupe : cette culture subissait une lyse partielle avec les phages Vi D₁, D₂, D₄ et D₅ et la lyse confluente avec le phage Vi D₆ (fig. 1c et tableau I, schéma 3). Ce ne

pouvait être un type D_1 (2) puisque la lyse était totale avec le phage Vi D_6 , et partielle seulement avec les autres phages Vi du groupe D. Ce ne pouvait être non plus un type D_6 , malgré la lyse totale avec le phage Vi D_6 , puisque les autres phages Vi du groupe produisaient une lyse importante quoique partielle.

En présence d'un tel schéma, il nous a semblé que la culture Dak. 3 était un mélange des types D_1 et D_6 dont les réactions se trouvaient en quelque sorte additionnées (tableau I, schéma 2).

La culture Dak. 3 est un mélange des deux types D_1 et D_6 . — Pour le prouver, nous avons pratiqué un isolement de germes sur plaque de gélose et nous avons prélevé au hasard 12 colonies. Notons incidemment que toutes les colonies présentaient la même morphologie et plus spécialement, à l'examen en transillumination oblique, l'irisation caractéristique (Nicolle, Jude et Le Minor, 1950 [5]), attestant que cette culture n'avait pas encore subi la dissociation Vi + \rightarrow Vi —. Les épreuves d'agglutination sur lame avaient montré, du reste, que la culture était agglutinable par le sérum anti-Vi et inagglutinable par le sérum anti-IX. C'était donc, tant par l'épreuve des sérum que par celle des phages Vi, une culture Vi pure.

Les subcultures des 12 colonies furent soumises à la lysotypie : 4 d'entre elles fournirent le schéma classique du type D_1 (fig. 1 a) et les 8 autres, celui, non moins caractéristique, du type D_6 (fig. 1 b). La culture Dak. 3 était donc bien un mélange, en proportions à peu près équivalentes, d'éléments D_1 et d'éléments D_6 .

Les 4 cultures D_1 appartenaient au type fermentatif I de Kristensen : elles faisaient fermenter le xylose, mais non l'arabinose. Les cultures D_6 ne faisaient fermenter aucun de ces deux glucides : elles devaient donc être classées dans le type II de Kristensen.

Précisons que le caractère xylose + n'est en aucune façon lié au type D_1 , pas plus que le caractère xylose — ne l'est au type D_6 . Il existe des D_1 xylose — et des D_6 xylose + (Olitzki, 1948 [6], Jude et Nicolle, 1949 [2]).

PROBLÈMES POSÉS PAR LA PRÉSENCE, DANS UNE MÊME CULTURE, DE DEUX TYPES BACTÉRIOPHAGIQUES APPARTENANT À DES TYPES FERMENTATIFS DIFFÉRENTS.

La présence, dans une même culture, de deux types bactériophagiques pouvait s'expliquer de plusieurs manières :

a) Ces deux types proviendraient d'une infection mixte provoquée par une double contamination avec un bacille typhique

(2) Nous emploierons désormais, pour simplifier, le mot type au lieu de sous-type chaque fois qu'il sera question des sous-types D_1 et D_6 .

du type D_1 et un bacille typhique du type D_6 . Une telle éventualité n'a théoriquement rien d'impossible. Il y a même tout lieu de penser qu'elle doit se produire avec une certaine fréquence. Mais on conçoit aisément que les infections mixtes passent presque toujours inaperçues, soit en raison de la prédominance numérique d'un germe sur l'autre, soit parce que les cultures qui parviennent aux Centres de lysotypie ont pour origine très souvent une colonie unique. Elles ne contiennent donc que l'un des éléments du mélange primitif éventuel. Notons à ce sujet que Helmer et coll., 1940 [7], ont isolé chez un même malade les types F_1 et F_2 . Mais il n'est pas possible de savoir s'il s'agit là d'une infection mixte ou bien de la transformation partielle d'un type en l'autre.

TABLEAU I. — Schéma des réactions des cultures de *S. typhi* des types D aux phages Vi spécifiques.

Schéma n°	Souches Vi	Préparations de phages Vi (Craigie & Felix. 1947)						
		C	DI	D2	D4	D5	D6	EI
I	DI	-	LT	LT	LT	<u>LT</u>	lp	-
	D2	-	-	LT	-	-	-	-
	D4	-	-	-	LT	-	-	-
	D5	-	-	-	-	LT	LT	-
	D6	-	-	-	-	-	LT	-
2	DI	-	LT	LT	LT	<u>LT</u>	lp	-
	D6	-	-	-	-	-	LT	-
	DI+D6	-	lp	lp	lp	lp	LT	-
3	culture Dak.3	-	lp	lp	lp	lp	LT	-

LT = lyse totale: la gélose est complètement dénudée à l'endroit où une goutte de la solution de phage a été déposée; éventuellement quelques colonies secondaires.

lp = lyse partielle: présence de plages bactériophagiennes non confluentes dans le gazon bactérien.

- = absence de lyse: culture normale à l'endroit où la goutte de dilution de phage a été déposée.

b) Le mélange a pu se produire au laboratoire par souillure accidentelle d'une culture du type D_1 par une culture du type D_6 ou inversement.

c) Il pouvait s'être produit, dans la culture primitivement homogène, une mutation de certains éléments D_1 en éléments D_6 ou d'éléments D_6 en éléments D_1 , mutation analogue aux altérations de types signalées par Craigie, 1942 [8], Craigie et Felix, 1947 [1] et Felix et Anderson, 1951 [9], avec le type F_2 et le type E_2 .

d) D'autre part, l'existence, dans une même culture, de deux types fermentatifs, peut s'expliquer par les mêmes hypothèses. Strietter, 1932 [10], a signalé un semblable mélange dans une culture fraîchement isolée. A ce sujet Kristensen, 1938 [4], hésitait à se prononcer entre une infection mixte et une transformation partielle.

Certains auteurs, en particulier Attimonelli, 1947 [11], Reul, 1949 [12], affirment avoir obtenu en culture la transformation d'un type en un autre.

Pour tenter de trancher ces questions, nous avons entrepris une étude détaillée de la culture Dak. 3. Nous avons d'abord cherché à préciser les proportions respectives des deux types bactériophagiques. Nous avons donc pratiqué de nouveaux isolements de colonies après plusieurs repiquages de la culture originelle.

DIMINUTION PROGRESSIVE DE LA PROPORTION EN ÉLÉMENTS D_1
AU COURS DES REPIQUAGES
ET MAINTIEN PARADOXAL DE LA PROPORTION DES ÉLÉMENTS
APPARTENANT AU TYPE FERMENTATIF I DE KRISTENSEN.

Dans la culture originelle Dak. 3. — Nous avons dit que le premier isolement de colonies nous avait donné la proportion de 8 colonies D_6 pour 4 colonies D_1 . Les isolements ultérieurs pratiqués après plusieurs repiquages de la culture Dak. 3 sur gélose inclinée nous montrèrent que cette proportion ne se maintenait pas.

Les pourcentages des deux types bactériophagiques se sont modifiés de la façon suivante (tableau II).

Il semble donc qu'au cours des repiquages, le type D_1 cède très rapidement la place au type D_6 .

Mais, à cette disparition presque complète du type D_1 , aurait dû correspondre une diminution parallèle du type fermentatif de Kristensen, puisque les éléments D_1 du mélange sont caractérisés par leur pouvoir d'attaquer le xylose.

A notre surprise, nous avons constaté que le type xylose + subissait une diminution sensiblement moindre (tableau II).

Le non parallélisme entre la diminution des pourcentages du type D_1 et du type xylose + s'explique par l'apparition de germes xylose + présentant les réactions du type D_6 .

Un examen plus attentif des résultats de la lysotypie nous a montré qu'en réalité il ne s'agissait pas de type D_6 véritable,

TABLEAU II. — Variations du nombre des types bactériophagiques et fermentatifs au cours des repiquages de la Souche Dak. 3.

Nombre de repiquages	Souche Dak. 3. — Pourcentages des types bactériophagiques		fermentatifs	
	DI	D ₆	xyl+	xyl-
3	16	84 [•]	36	64
5	6	94 ^{..}	19	81
9	4	96 ^{...}	14	86

[•] = dont 20 du type xylose positif

^{..} = dont 13 du type xylose positif

^{...} = dont 10 du type xylose positif

mais d'un type « D₆ imparfait » caractérisé par une lyse partielle au lieu d'une lyse totale avec le phage D₆, et l'absence de lyse avec les autres phages Vi D. La lyse partielle produite avec le phage Vi D₆ est identique à celle que l'on observe avec le même phage sur le type D₁.

Dès lors, il nous a semblé que ces bactilles, donnant la réaction imparfaite du type D₆, pouvaient bien être des bactilles du type D₁ ayant acquis une insensibilité totale aux phages D₁, D₂, D₄ et D₅, et ayant gardé leur sensibilité partielle au phage D₆ et leur caractère xylose +. La transformation des germes D₁ en germes D₆ imparfait s'est produite de toute évidence au cours des repiquages de la culture Dak. 3. Que se passerait-il si l'on pratiquait artificiellement un mélange de bactilles des types D₁ xylose + et D₆ xylose — ?

Dans un mélange artificiel de culture D₁ et de culture D₆. — Nous avonsensemencé des tubes d'eau peptonée avec un même volume de cultures des types D₁ xylose + et D₆ xylose — de même âge et d'opacité égale provenant l'une et l'autre de colonies isolées de la culture originelle Dak. 3.

Ces deux cultures, malgré de nombreux repiquages, avaient gardé leurs caractères lysotypiques et fermentatifs.

Les mélanges en eau peptonée, après vingt-quatre heures d'étuve, ont été repiqués en série sur gélose inclinée. Les résultats de ces deux expériences (mélange 1 et mélange 2) figurent au tableau III.

Les résultats de ces deux expériences sont superposables dans leur ensemble à ceux qui ont été rapportés au tableau II : disparition totale ou presque totale du type D₁, diminution moins

TABLEAU III. — Variations du nombre des types bactériophagiques et fermentatifs au cours des repiquages des mélanges cult. *D₁* et cult. *D₆*.

Mélange artificiel n°	Nombre de repiquages	Pourcentages des types dans les mélanges cult. <i>D₁</i> + cult. <i>D₆</i>					
		types bactériophagiques	<i>D₁</i>	<i>D₆</i>	<i>D₆</i> imp.	n.c	types fermentatifs
1	5	26	68	6	0	32	68
	20	2	50	27	21°	47	53
2	0	43	57	0	0	43	57
	2	15	84	1	0	16	84
	14	0	69	19	12°°	28	72

imp. = imparfait

n.c = non caractérisable

° = dont 18 du type xylose positif

°° = dont 9 du type xylose positif

importante du type xylose +. Mais on note, surtout après un grand nombre de repiquages, l'apparition de formes non caractérisables par perte de l'antigène Vi. Cette altération nous a empêchés de prolonger les expériences. La plupart de ces formes non caractérisables appartenaient au type xylose +.

Parmi les 21 colonies non caractérisables du mélange 1, après le vingtième repiquage, 3 étaient du type II de Kristensen, les autres du type I. Ces caractères fermentatifs permettent de supposer que les bacilles ayant donné naissance aux 3 premières étaient initialement du type *D₆*, et que les 18 autres étaient soit du type *D₁*, soit du type *D₆* imparfait. Une constatation analogue a été faite après le quatorzième repiquage du mélange 2 : parmi les 12 colonies non caractérisables, 9 qui attaquaient le xylose avaient vraisemblablement pour origine des bacilles du type *D₁*, ou du type *D₆* imparfait.

HYPOTHÈSES SUR LA CAUSE DES VARIATIONS OBSERVÉES DANS LES PROPORTIONS DES TYPES BACTÉRIOPHAGIQUES.

Les bacilles du type *D₁* disparaissent de la culture au cours des repiquages. Cette disparition ne serait-elle pas due à un phénomène d'antagonisme exercé par le type *D₆* au détriment du type *D₁*? Dans ce cas, on devrait constater une diminution parallèle du type xylose +. La lecture des tableaux précédents

a montré qu'il n'en était rien. Il faut donc penser à une transformation du type D_1 en type D_6 avec conservation du pouvoir d'attaquer le xylose.

D'après de nombreux auteurs, les types bactériophagiques individualisés par Craigie et Yen, 1938 [13] et par Craigie et Felix, 1947 [4], sont remarquablement stables, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. C'est même cette stabilité qui confère la grande valeur épidémiologique à la lysotypie du bacille typhique. Cependant, Craigie lui-même, 1940 [14], puis Craigie et Felix, 1947 [4], admettent, dans certains cas, la transformation des types B_1 , C , D_5 , F_1 , N , O et T en type A , par extension de la sensibilité des cultures à tous les phages Vi de Craigie et Felix (cultures Vi-dégradées de Felix [15]). On sait en effet que le type A est lysé, non seulement par son phage homologue (phage Vi A), mais aussi par tous les phages Vi spécifiques des autres types.

De notre côté, nous avons eu l'occasion d'observer la transformation en type A d'un bacille du type D_1 : au cours des nombreux isolements de germes (plusieurs milliers) que nous avons pratiqués pendant l'exécution de ce travail sur une culture D_1 xylose +, nous avons isolé une fois une colonie dont les subcultures ont donné régulièrement les réactions du type A xylose +.

En dehors de cette « dégradation » de la sensibilité spécifique, on a observé parfois des variations de types dues à l'action de bactériophages. Ces variations peuvent se manifester soit par un déplacement de la zone sensible d'un type vers un type voisin, soit par restriction de la sensibilité. Craigie, dès 1942 [8], avait admis que sous l'influence de bactériophages provenant de cultures lysogènes de *S. typhi*, il survenait des changements dans les bactéries ayant échappé à l'action lytique (cultures secondaires). Ces bactériophages, « phages latents » ou « agents γ », se rencontrent régulièrement dans les cultures du groupe des types D . La souche classique de *S. typhi* Vi₁ de Bhatnagar, Speechly et Singh, 1938 [16], appartient au type D_1 . Son phage latent, en se fixant sur un bacille du type E_1 , le transforme en type D_1 .

Les souches ainsi infectées artificiellement par l'agent γ montrent une remarquable stabilité malgré des subcultures répétées. Cependant Craigie, 1946 [17], pense que, si cette conversion limitée de type peut s'obtenir dans les conditions du laboratoire, il est peu probable qu'un tel changement puisse survenir fréquemment dans la nature. La lysotypie de *S. typhi* par les phages Vi conserve donc toute sa valeur en épidémiologie.

Récemment, Felix et Anderson, 1951 [9], ont constaté des faits identiques. Ces auteurs ont réussi, en traitant un bacille du type A par des phages extraits de cultures lysogènes, à obtenir des bacil-

les ayant acquis le plus souvent le type de ceux qui avaient fourni les phages : ainsi une culture du type A mise en contact avec les phages d_1 , d_4 , d_6 et t provenant respectivement des types D_1 , D_4 , D_6 et T a donné, suivant le phage utilisé, une culture des types D_1 , D_1 imparfait, D_6 et T imparfait. D'autres transformations de types ont été obtenues à la suite du traitement par le phage f_2 dérivé du type F_2 ; parmi ces transformations, on observe celle du type D_1 en D_6 .

De telles transformations de types sous l'influence des phages de lysogénéité ont été obtenues chez *S. paratyphi* B : Nicolle, Hamon et Edlinger, 1951 [18], ont montré que presque tous les types de cette espèce sont lysogènes et que le ou les phages portés par chaque type jouent certainement un rôle dans l'appartenance du bacille aux divers types de Felix et Callow, 1943 [19]. Hamon et Nicolle, 1951 [20], ont réussi, en utilisant les phages extraits de différents types, à transformer certains types. Les bacilles lysogènes élaborent parfois un seul phage qui peut être « déterminant » pour le type ou « indifférent ». Le plus souvent ils possèdent plusieurs phages dont un seul ou deux sont déterminants.

Les bactériophages des bacilles lysogènes ont donc une grande importance soit pour déterminer l'appartenance naturelle aux types de *S. typhi* et de *S. paratyphi* B, soit pour transformer artificiellement un type en un autre type.

Nous nous sommes demandé si la transformation du type D_1 en type D_6 imparfait, dans la culture mixte Dak. 3, n'était pas due précisément à l'action d'un phage.

Lysogénéité des types D_1 et D_6 . — Un ensemencement en bouillon digestion a été fait à partir d'une subculture du type D_1 xylose +, provenant d'un isolement de germes de la souche Dak. 3. Après vingt-quatre heures d'étuve, la culture a été filtrée sur bougie L_3 . Le filtrat pur et ses dilutions ont été éprouvés sur plaques de gélose ensemencées avec une culture du type A. De nombreuses plages, très petites mais visibles, se sont formées dans le gazon bactérien. Le phage extrait du type D_1 (d_1) (3), régénéré sur la culture du type A en bouillon digestion additionné de $CaCl_2$, a atteint le titre de 2×10^6 corpuseules par centimètre cube. Eprouvé sur les cultures Vi de *S. typhi* appartenant aux différents types, ainsi que sur plusieurs cultures du même germe dépourvues d'antigène Vi, il s'est montré souvent actif (tableau IV). La culture D_1 est donc lysogène, mais le phage d_1 qu'elle met en liberté n'est pas un phage Vi.

(3) Suivant la règle de nomenclature adoptée par Felix et Anderson, 1951 [9], les phages extraits des cultures des types D_1 et D_6 sont désignés sous les signes d_1 et d_6 .

TABLEAU IV. — Action des phages d_1 et d_6 sur des cultures Vi de *S. typhi*. Toutes les cultures de types non figurés sur le tableau ont donné des résultats négatifs avec les deux phages.

Phages	Cult. n°	Types des cultures Vi de <i>Salmonella typhi</i>									
		A	C	DI	D5	E1	E2	K	LI	O	
d_1	1	+++	-	+	++	+++	++	-	-	+	
	2	-	+++	++		+++					
	3	+++		-							
d_6	1	-	-	-	+	-	+++	++	++	++	
	2	-	+++		+						
	3	+++									

- = aucune action lytique
 + = 10 plages environ
 ++ = 100 plages environ
 +++ = plus de 100 plages

Au contraire, par les mêmes manipulations, nous avons pu isoler, mais plus difficilement, d'une subculture d'une colonie D_6 xylose —, un phage (d_6) n'atteignant au cours de sa régénération sur la culture type A qu'un titre très bas : 4×10^4 . Ce phage a manifesté des propriétés lytiques sur certaines cultures Vi de *S. typhi* et s'est montré totalement inactif sur les cultures dépourvues de l'antigène Vi (tableau V). Le phage d_6 est donc un phage Vi. C'est un principe lytique faible et à gamme d'activité restreinte.

TABLEAU V. — Action des phages d_1 et d_6 sur des cultures de *S. typhi* dépourvues d'antigène Vi.

Phages	Cultures de <i>S. typhi</i> dépourvues d'antigène Vi											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
d_1	-	++	++	-	++	-	-	-	++	+++	-	-
d_6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- = aucune action lytique
 + = 10 plages environ
 ++ = 100 plages environ
 +++ = plus de 100 plages

MODIFICATION DU TYPE BACTÉRIOPHAGIQUE DES CULTURES D_1
SOUS L'INFLUENCE DU PHAGE d_6 .

Le phage d_1 , mis en contact à 37° pendant plusieurs heures avec une culture en eau peptonée du type D_6 xylose —, a produit une lyse facilement perceptible suivie de l'apparition d'une culture secondaire tardive. 160 colonies isolées de cette culture secondaire ont fourni des subcultures qui toutes avaient gardé le type bactériophagique et le type fermentatif de la culture initiale. Le phage d_1 est donc incapable de modifier les caractères du type D_6 . C'est un phage « indifférent » pour le type bactériophagique.

Il en va autrement avec le phage Vi extrait du type D_6 (phage d_6) : nous avons ensemencé avec une culture du type D_1 xylose + le lysat obtenu par l'action du phage d_6 sur une culture du type A en bouillon digestion. Après six heures d'étuve à 37°, nous avons pratiqué un isolement sur plaque de gélose et prélevé 50 colonies pour la détermination des caractères lyso-typiques et fermentatifs. Toutes les colonies étaient restées xylose +, mais 40, soit 80 p. 100, étaient devenues du type bactériophagique D_6 imparfait. 10 colonies (20 p. 100) avaient gardé le type D_1 initial. Une culture témoin du type D_1 , en bouillon digestion, soumise aux mêmes épreuves, n'a montré après vingt-quatre heures d'étuve aucun changement parmi les 50 colonies isolées.

EVOLUTION DES TYPES BACTÉRIOPHAGIQUES
DANS UNE CULTURE DU TYPE D_1 EN PRÉSENCE DU PHAGE d_6 .

Nous avons ensemencé le lysat d'une culture de type A en bouillon digestion par le phage d_6 avec une culture D_1 xylose +. Le tube a été maintenu à 37° pendant vingt-quatre heures. À intervalles réguliers, des isolements de germes ont été faits sur plaques de gélose pour la numération des germes viables et la détermination des types bactériophagiques et fermentatifs. Ces déterminations ont été faites sur 100 colonies pour chaque prélèvement.

De plus, les mêmes opérations ont été pratiquées sur une culture témoin du type D_1 en bouillon digestion.

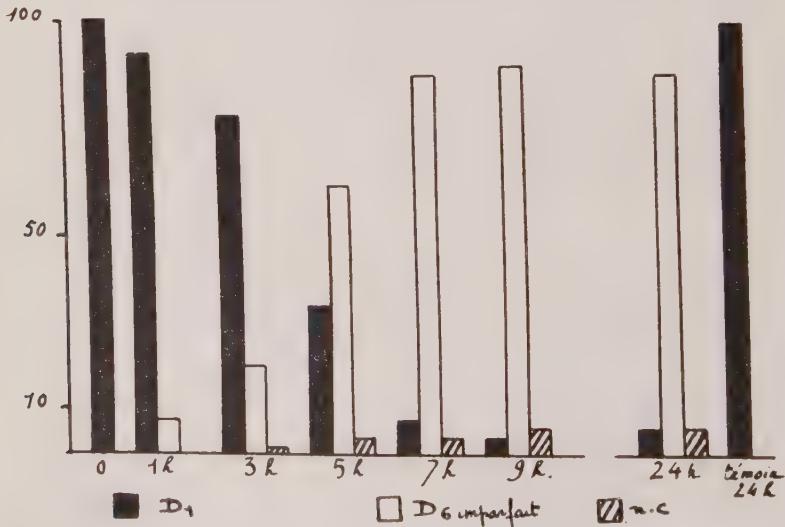
Les résultats figurent dans le tableau VI et sont schématisés dans le graphique 1.

On constate en premier lieu un retard assez marqué de l'augmentation des germes viables dans la culture du type D_1 en présence du phage d_6 , par rapport à la culture témoin. Cependant, après vingt-quatre heures d'étuve, les deux cultures contenaient un nombre de germes viables sensiblement analogue.

Au fur et à mesure des prélèvements, on constate une diminution rapide du pourcentage des bacilles du type D_1 avec appa-

TABLEAU VI. — Évolution des types bactériophagiques de la culture D_1 en présence du phage d_6 .

Moments des prélevements (heures)	Nombre de germes vivants par centimètre-cube		Pourcentages des types dans le mélange cult. D_1 + phage d_6 .				
	cult. D_1 en bouil. digestion	cult. D_1 + phage d_6	DI	D_6	n.c.	types fermentatifs	
		imp.	imp.	imp.			
0	20.000	18.000	100	0	0	100	0
1	19.000	20.000	92	8	0	100	0
2	50.000	18.000					
3	124.000	23.000	78	20	2	100	0
4	437.000	31.000					
5	1.400.000	77.000	34	62	4	100	0
6	6.200.000	133.000					
7	17.800.000	472.000	8	88	4	100	0
8	122.000.000	2.900.000					
9	274.000.000	17.000.000	4	90	6	100	0
10	285.000.000	37.000.000					
24	300.000.000	400.000.000	6	88	6	100	0

GRAPHIQUE 1. — Variations des types bactériophagiques et fermentatifs dans le mélange culture D_1 + phage d_6 .

rition, puis augmentation de celui des bacilles du type D_6 imparfait et l'apparition d'une faible proportion de bacilles non caractérisables par perte de l'antigène Vi. Dans aucun cas, il n'y a eu de changement du type fermentatif : toutes les subcultures des colonies, qu'elles fussent du type D_1 ou D_6 imparfait, attaquaient le xylose.

Par la méthode suivie, on a pu assister, par conséquent, à la substitution progressive du type D_6 imparfait au type D_1 sous l'effet du bactériophage Vi d_6 .

STABILITÉ DU TYPE BACTÉRIOPHAGIQUE ACQUIS.

Il était intéressant de vérifier si le retour au type bactériophage initial était possible en débarrassant la bactérie de son phage de lysogénéité acquise. On sait que la lysogénéité artificiellement acquise est moins stable que la lysogénéité naturelle (Bordet et Renaux, 1928 [21], et Burnet, 1932 [22]). Nous avons utilisé le formol (Nicolle, 1947 [23], Nicolle, Jude et Buttiaux, 1950 [24], Nicolle, Hamon et Edlinger, 1951 [18]) pour éliminer le bactériophage. Dans certains cas le retour au type D_1 initial a pu être obtenu. La stabilité du type bactériophagique acquis semble donc moins solide que celle du type naturel.

DISCUSSION.

Peut-on, à la lumière de ces expériences, expliquer pourquoi la culture Dak. 3 contenait deux sous-types bactériophagiques ?

Nos résultats ont montré qu'il y avait incompatibilité entre la présence du type D_1 et du type D_6 dans la culture Dak. 3. Le type D_1 disparaissait rapidement pour faire place à un type D_6 imparfait. Ce dernier gardait cependant le caractère xylose + du type D_1 initial. Ces faits tendent à éliminer l'éventualité d'une infection mixte et celle d'une mutation du type D_1 en type D_6 . En effet, tous les germes du type D_6 dans la souche Dak. 3 initiale étaient xylose —, tandis que les germes D_1 transformés en D_6 imparfait étaient restés xylose +. La seule explication satisfaisante paraît donc être une contamination accidentelle au laboratoire d'une culture d'un des types avec une culture de l'autre type.

CONCLUSIONS.

La culture de *S. typhi* Dak. 3 contenait en proportion à peu près égale des germes appartenant aux deux sous-types bactériophagiques D_1 et D_6 . Les premiers attaquaient le xylose, les seconds le laissaient intact. Par repiquages en série, le type D_1 xylose + a disparu rapidement. Il a été remplacé non par le

type D_6 xylose —, mais par un type D_6 imparfait attaquant le xylose.

Les deux types D_1 et D_6 étaient lysogènes. Le D_1 contenait un phage actif indifféremment sur des souches Vi ou non Vi de *S. typhi*. Mis en contact avec une culture du type D_6 , il ne provoquait aucune transformation de ce type. Le phage extrait du type D_6 , au contraire, était un phage Vi. Il transformait le D_1 xylose + en D_6 imparfait xylose +. La disparition du type D_1 dans la culture mixte était donc due au phage élaboré par le type D_6 . Ce type D_6 imparfait était moins stable que les types naturels.

L'évolution des types bactériophagiques dans une culture D_1 en présence du phage d_6 a été suivie méthodiquement.

Ces faits montrent l'existence d'une incompatibilité entre des sous-types bactériophagiques d'un même groupe de type.

Cette incompatibilité est due à la présence, chez l'un des types, d'un phage Vi qui modifie le caractère bactériophagique de l'autre type, mais se montre sans action sur le caractère fermentatif.

Il paraît assez vraisemblable que la présence de deux types dans la culture Dak. 3 est due à une contamination accidentelle.

L'apparition spontanée (mutation ?) d'un germe de type A xylose + dans une culture de type D_1 a été constatée.

Résumé. — Une culture de *S. typhi* était composée de deux types bactériophagiques D_1 et D_6 qui appartenaient à des types fermentatifs différents.

Par repiquages, le type D_1 a disparu : cette disparition était due à l'action d'un phage Vi porté par les bacilles du type D_6 . Le type D_1 a été transformé en type D_6 imparfait qui gardait le caractère fermentatif initial.

Sous l'influence d'un phage Vi porté par les bacilles du type D_6 , il s'était transformé en type D_6 imparfait, tout en conservant son type fermentatif. Ces observations sont exactement superposables à celles qui ont été décrites par Felix et Anderson, 1951 [9], dans le cas des types F_1 et F_2 .

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. CRAIGIE et A. FELIX. *Lancet*, 1947, **1**, 823.
- [2] A. JUDE et P. NICOLLE. Ces *Annales*, 1949, **77**, 550.
- [3] P. NICOLLE et A. JUDE. *Rev. Immunol.*, 1951, **45**, 31.
- [4] M. KRISTENSEN. *J. Hyg.*, 1938, **38**, 688.
- [5] P. NICOLLE, A. JUDE et L. LE MINOR. Ces *Annales*, 1950, **78**, 572.
- [6] A. L. OLITZKI, M. SHELUBSKY et W. STRAUSS. *Harefuah*, Tel Aviv, 1948, 107.
- [7] D. E. HELMER, D. E. KERR, C. E. DOLMAN et L. E. RANTA. *Canad. publ. Health J.*, 1940, **31**, 433.

- [8] J. CRAIGIE. *Canad. publ. Health J.*, 1942, **33**, 41.
- [9] A. FELIX et E. S. ANDERSON. *Nature*, 1951, **167**, 603.
- [10] V. A. STRIETTER. *Arch. Sci. Biol.*, 1934, **35**, 883 et 890.
- [11] R. ATTIMONELLI. *Giorn. Batt. e Immunol. ital.*, 1947, **31**, 197.
- [12] R. REUL. *Ann. Soc. belge méd. trop.*, 1949, **29**, 339.
- [13] J. CRAIGIE et Ch. YEN. *Canad. publ. Health J.*, 1938, **29**, 448 et 484.
- [14] J. CRAIGIE. *Canad. publ. Health J.*, 1940, **31**, 4.
- [15] A. FELIX. Communication personnelle et Congrès International de Microbiologie, Rio de Janeiro, août 1950.
- [16] S. S. BHATNAGAR, C. G. SPEECHLY et M. SINGH. *J. Hyg.*, 1938, **38**, 663.
- [17] J. CRAIGIE. *Bact. Rev.*, 1946, **10**, 73.
- [18] P. NICOLLE, Y. HAMON et E. EDLINGER. Ces *Annales*, 1951, **80**, 479.
- [19] A. FELIX et B. R. CALLOW. *Brit. med. J.*, 1943, **2**, 127.
- [20] Y. HAMON et P. NICOLLE. Ces *Annales*, 1951, **80**, 496.
- [21] J. BORDET et E. RENAUD. Ces *Annales*, 1928, **42**, 1283.
- [22] F. M. BURNET. *J. Path. a. Bact.*, 1932, **35**, 851.
- [23] P. NICOLLE. Ces *Annales*, 1947, **73**, 705.
- [24] P. NICOLLE, A. JUDE et R. BUTTIAUX. Ces *Annales*, 1950, **79**, 246.

LA « CŒLOGENÈSE » NEVRAXIQUE DU VIRUS COXSACKIE

par C. LEVADITI.

(*Institut Alfred-Fournier et Institut National d'Hygiène.*)

Un certain nombre d'ultraviruses neurotropes ont la propriété de déclencher dans le névraxe central (encéphale et moelle épinière) un processus de cavitation d'une structure et d'un mécanisme pathogénique éminemment intéressants. Je propose le terme de *cœlogénèse* (du grec *γολλος*, creux (1), et *γένεσις*, naissance) pour désigner ce phénomène singulier. Or, le virus neurotrophe Coxsackie *type B*, découvert par Dalldorf et Sickles [1] (dont les constatations ont été confirmées par Dalldorf, Sickles, Plager et Gifford [2], Melnick, Shaw et Curnen [3], Howitt [4], Armstrong et coll. [5], etc.), est doué de ce pouvoir cœlogénétique dont nous avons déjà eu l'occasion de parler dans un article paru en 1950 [6]. Nos recherches ultérieures concernant cette cavitation provoquée par le virus Coxsackie nous ayant permis d'en préciser la signification et le mécanisme histo-pathologique, nous leur consacrons le présent mémoire.

Après une description des méthodes expérimentales utilisées, nous essaierons de déterminer les principaux caractères cytologiques du processus, ainsi que le mécanisme qui préside à l'apparition des cavités, pour terminer par une comparaison entre la cœlogénèse provoquée par la souche encéphalitogène du virus Coxsackie (que nous désignerons par l'abréviation : *type B*) et celles dues à d'autres virus, en particulier ceux de l'*herpès* et de l'*encéphalite du Renard*, objet de certaines de nos recherches déjà anciennes.

★★

Rappelons d'abord brièvement qu'il existe de nombreux *types* de virus Coxsackie, définissables sérologiquement, dont l'un, le *type B*, est particulièrement et spécifiquement neurotrophe, alors

(1) On trouve la même racine dans le terme : « *cœlomyélie* » proposé par H. Roger en 1892 pour désigner les cavités pathologiques de la moelle épinière.

que les autres (*types A, C, D, etc.*) présentent une affinité sélective à l'égard des muscles striés. Mentionnons, par ailleurs, un fait actuellement indiscutable, à savoir que les virus Coxsackie ne sont pathogènes que pour les souriceaux nouveau-nés, âgés de 2 à 5-6 jours (non encore sevrés), leur activité morbigène étant nulle pour les souris adultes. *Seuls des éléments cellulaires (neurones ou myocytes) en voie d'évolution constituent un milieu de synthèse propice au développement de ces ultragermes au sein du complexe nucléo-protidique représenté par le noyau et le cytoplasme des neurocytes et de ces myocytes.* L'alimentation lactée intervient-elle pour assurer l'efficacité de l'attaque de ces virus, comme c'est également le cas dans la cancérigénèse ? C'est là un point qui reste encore obscur.

Ceci dit, signalons que toutes nos recherches ont été effectuées avec le *type B* que MM. Dalldorf et Sickles ont bien voulu nous faire parvenir, ce dont nous les remercions très cordialement. Nos remerciements s'adressent également à MM. Vaisman et Dunoyer, qui ont mis au point l'expérimentation chez l'animal.

Historique des constatations concernant l'affinité névraxique du *type B*.

En 1948 et 1949, ni Dalldorf et Sickles [7], ni Dalldorf, Sickles, Plager et Gifford [2] n'insistent sur l'affinité neurotrophe des souches isolées par eux, le problème, plus frappant, posé par l'affinité myotrope de ces virus ayant retenu toute leur attention. Pour la première fois, en 1950, Dalldorf [8] montre que le *type B* « provoque également des lésions du cerveau », lésions que bientôt cet auteur devait décrire magistralement [9] : « Les souriceaux du groupe B présentent une encéphalopathie intense. Celle-ci concerne les hémisphères cérébraux et consiste d'abord en une destruction des neurones, à laquelle fait suite un ramollissement de la substance fondamentale, aboutissant à une *dégénérescence kystique*. Des lésions moins importantes se produisent dans le reste du névrax, mais, en général, elles s'arrêtent à la partie supérieure de la moelle épinière. En aucun cas nous n'avons observé de destruction des cornes antérieures de cette moelle et ce n'est que rarement que les lobes olfactifs ont été atteints ». Deux photomicrographies accompagnent ce travail, dont l'une représente des lésions précoces du cerveau, avec désintégration (fonte) des cellules parenchymateuses au niveau du cortex, et l'autre des altérations cérébrales plus tardives avec vacuolisation de l'encéphale.

D'autre part, Melnick [10] affirme, preuves photomicrographiques à l'appui, que « la lésion du cerveau, spécialement dans l'hippocampe, est caractérisée par une lyse des cellules ganglion-

naires (neurones) et par la présence de débris nucléaires fragmentés ou dispersés. La dégénérescence du tissu nerveux se manifeste par une perte de son architecture, qui fait place à un *matériel d'aspect spongieux* contenant de *gros phagocytes*. On décèle également une augmentation du nombre des éléments cellulaires au niveau des leptoméninges ». L'auteur ajoute, par ailleurs, que la virulence du système musculaire est supérieure à celle de l'encéphale. Les deux figures qui accompagnent ce mémoire représentent les lésions encéphaliques d'un souriceau âgé de 7 jours, sacrifié le deuxième jour de sa paralysie (grossissements : 60 × 1 et 240 × 1).

Nous-même [6] avons donné, en 1950, une description sommaire des altérations microscopiques de l'encéphalite des jeunes souriceaux contaminés avec le *type B* de Dalldorf, description dont voici l'essentiel (2 photomicrographies accompagnent ce travail) :

« Souriceaux âgés de 3 à 4 jours. Encéphalite diffuse, péri-vasculaire monocytaire, infiltration du parenchyme par des poly-nucléaires caryolysés ou oxyphiles, légère neuronophagie. Au niveau de la corne d'Ammon, formation de cavités tissulaires avec destruction intense des cellules nerveuses. Le processus semble débuter par une chromatolyse et une disparition intégrale des corps de Nissl. Le neurone s'hypertrophie, dégénère, puis se désintègre, donnant ainsi lieu à la *formation de cavités plus ou moins confluentes*. Les noyaux de certaines cellules nerveuses présentent des modifications ressemblant à celles de l'*herpès* (augmentation de volume, oxyphilie du nucléoplasme, accollement de la chromatine à la paroi nucléaire). Enfin, des monocytes renferment dans leur cytoplasme, d'une part des *inclusions oxyphiles*, d'autre part une poussière de *fines granulations légèrement basophiles*, dont l'accumulation dans des vacuoles comprime les noyaux et les déplace, les rendant ainsi excentriques. »



Or, si les trois derniers travaux cités ci-dessus comportent une description de l'encéphalopathie provoquée par le *type B*, avec mention des effets cœlogénétiques de cette souche, aucun auteur n'a étudié le mécanisme de la cœlogénèse, ni la signification des éléments cytologiques qui participent à l'apparition de ce singulier phénomène. C'est principalement de ces problèmes qu'il sera question ici.

TECHNIQUE. — Des souriceaux non-sevrés, âgés de 3 jours, sont inoculés, par voie transcranienne, avec une suspension à 1/10 de virus *B*. Ils sont sacrifiés malades le cinquième jour. Fixation de l'encéphale au Bouin-Brasil, coloration au Giemsa lent ou au bleu

de Unna, à l'hématoxyline ferrique (coloration double au rouge neutre) et à l'hématine-éosine (2).

RÉSULTATS.

Il va de soi que les altérations encéphaliques sont de *trois ordres*, soit :

- 1^o *Lésions méningées*,
- 2^o *Lésions des éléments nobles* (neurones),
- 3^o *Lésions de la substance blanche* [rappelant celles des « leuconévraxites » (3)] et aboutissant à la cœlogénèse.

Il n'est, pour s'en rendre compte, que d'examiner les microphotographies et les schémas ci-après.

1^o ALTÉRATIONS MÉNINGÉES.

Les méninges corticales, ainsi que les plexus choroïdes, sont le siège de modifications cytologiques qui débutent dès la sixième ou la douzième heure, ainsi qu'il ressort de l'essai suivant :

EXPÉRIENCE. — Un mélange d'encéphales de 10 souriceaux (inoculés par voie transcranienne), morts le troisième jour, ou sacrifiés malades le troisième ou le quatrième jour de l'évolution de l'encéphalite à virus B, est administré, par voie cérébrale, à 14 souriceaux neufs, lesquels sont examinés, 2 par 2, les sixième, douzième, dix-huitième, vingt-quatrième, trente-sixième, quarante-huitième et soixante-douzième heures après l'inoculation. On constate que la méningite, qui se déclare, comme nous venons de le dire, dès la sixième ou la douzième heure, s'intensifie par la suite et atteint son maximum à la trente-sixième heure.

Il s'agit d'un processus caractérisé par une accumulation progressive de lymphocytes, de polynucléaires et, ça et là, de macrophages volumineux, dont quelques-uns ont phagocyté de rares hématies.

2^o ALTÉRATIONS NEURONIQUES.

Ces altérations intéressent les neurones de la corticalité, de la région de l'hippocampe et surtout des trois couches de la corne

(2) Nous remercions M^{le} Barrat et M^{me} Dunoyer, qui ont effectué la partie histologique de ce travail.

(3) Nous avons proposé de désigner les modifications histologiques de la substance blanche par le terme : *leuconévraxites*, plus approprié que celui de *leucoencéphalites*, utilisé récemment par M. François Lhermitte (*Les leucoencéphalites*, Flammarion, éditeur, Paris, 1951). Voir, au sujet de la pathologie des leuconévraxites, le travail publié tout dernièrement par Lumsden (*Brit. Med. J.*, 1951, n° 4714, 1035).

d'Ammon. On en décèle dès la douzième heure, suivies, à partir de ce moment, d'une alternance de la neuronolyse, à laquelle se substituent, vers le deuxième jour, des lésions constantes et de plus en plus térebrantes. La figure 1 représente (à un petit grossissement : 170×1) de telles altérations des éléments nobles au niveau des trois couches de la corne d'Ammon (le cinquième jour). Un grossissement de 1400×1 (fig. 2) permet



FIG. 1. — Souriceau 1712. Sacréfié le cinquième jour. Hématoxyline ferrique + rouge neutre. (Gross. : 170×1). Cercle *a* : corne d'Ammon, couches externe et interne. En *b* : lésions encéphalitiques intenses au point de jonction de ces deux couches. En *c* : mêmes lésions, plus accentuées, dans la zone médiane de la corne d'Ammon. En *d* : sinus latéral. (Cette microphotographie et les suivantes ont été exécutées par M. Manigault, de l'Institut Pasteur.)

d'observer l'état de ces neurones et l'envahissement des interstices neuroniques par des leucocytes polynucléaires. Cet envahissement apparaît plus nettement encore dans la figure 3 (même grossissement ; coloration au Giemsa). A ce niveau, les polynucléaires sont en voie de caryolyse et intensément oxyphiles. Les neurones présentent des signes nets de chromatolyse ; leurs noyaux, déformés, se colorent mal ; la neuronophagie est cependant discrète. A un stade plus avancé du processus, les neurocytes se fragmentent et se transforment en débris à peine identifiables.

Un fait est évident : c'est la *dégénérescence ballonnée* de certains neurones, dont l'état rappelle celui de ces mêmes éléments au cours de l'infection herpétique expérimentale du lapin. La basi-chromatine se condense sous forme de grains, qui se dispersent et s'accolent à la membrane, cependant que l'oxy-chromatine la remplace au sein de la masse nucléaire (fig. 3).

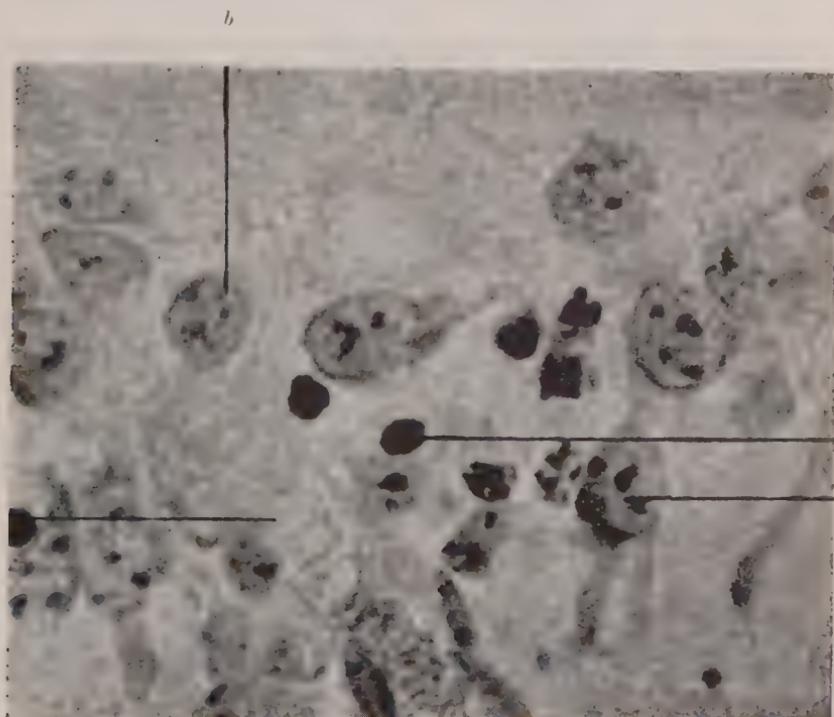


FIG. 2. — Souriceau 1715. Sacrifié le cinquième jour. Giemsa lent. (Gross. : 1 400 \times 1.) Corne d'Ammon. En a : vaisseau néoformé. En b et d : neurones dégénérés. En c : noyaux de polynucléaires caryolytés et oxyphiles.

En résumé, un processus lytique intense, témoignant d'une affinité élective du virus B pour les éléments nobles du nerf râpe, nous autorise à classer ce virus parmi ceux des ECTODERMOSES NEUROTROPES proprement dites.

3^e COELOGÉNÈSE.

La coelogénèse est l'aboutissement final de ce processus encéphalitique, en lui-même extrêmement rapide, puisqu'il provoque

la mort des souriceaux en deux, trois ou cinq jours au maximum. Nous l'avons constatée dès le troisième ou le quatrième jour, le moment de son apparition variant d'ailleurs d'un sujet à l'autre dans une même série de souriceaux (contaminés toujours par voie transcrânienne). Voici une description sommaire, et quelque peu schématique, de ce processus de cavitation :

Très précocement après l'inoculation, on observe dans diverses

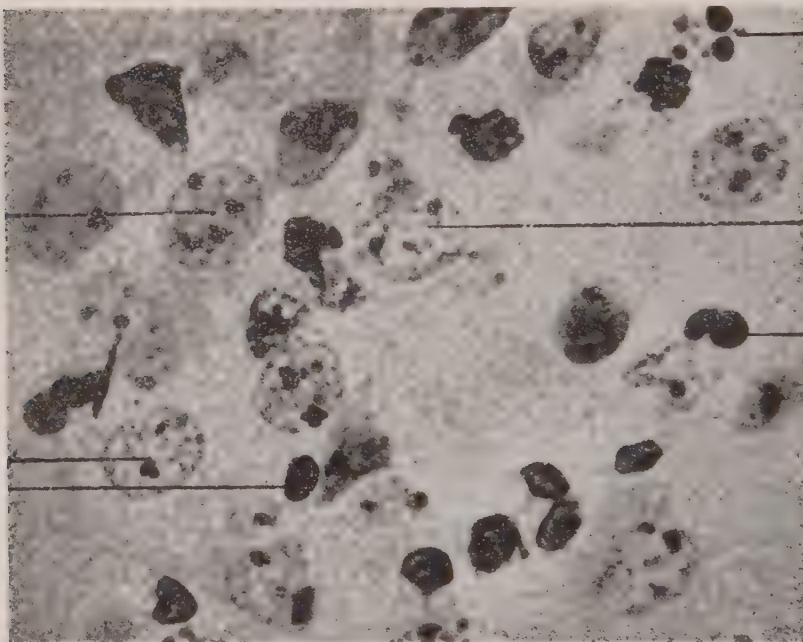


FIG. 3. — Souriceau 17/5. Sacrifice le cinquième jour. Unna + hématoxyline ferrique. (Gross. : 1 400 \times 1.) Dégénérescence balloonnée, type herpétique, des neurones (corne d'Ammon). En a : polynucléaire caryolyse et oxyphile. En b : Id. En c : Id. En d, e et f : noyaux de neurones atteints de dégénérescence ballonnée, type herpétique.

zones cérébrales (corticalité, hippocampe et, parfois, la corne d'Ammon) des hémorragies plus ou moins diffuses, se situant principalement dans la substance blanche. Celle-ci subit progressivement une dégénérescence oxyophile, faisant suite à une nécrobiose à laquelle participent à la fois le processus hémorragique et l'action propre du virus. Des polynucléaires et de petits monocytés envahissent cette région nécrobiosée et, en fort peu de temps, les éléments diapédétiques se caryolysent et deviennent à leur tour oxyphiles.

C'est généralement aux dépens de cette nécrobiose que s'effectue la cœlogénèse. Au fur et à mesure que celle-ci évolue, la présence de cavités de plus en plus volumineuses confère au tissu nerveux un aspect spongieux, peu importe qu'il s'agisse de plages neuro-niques, ou de régions déterminées de la substance blanche. La figure 4 (cercle) indique l'emplacement de ces cavités cœlogénétiques dans la zone corticale de l'encéphale (grossissement :



FIG. 4. — Souriceau 1712. Sacrifié le cinquième jour. Hématoxyline ferrique. (Gross. : 47 \times 1.) En a : cercle entourant une zone de cavitation dans la corticalité, près du sinus médian.

17 \times 1); la coloration à l'hématoxyline ferrique les met en valeur. À un grossissement plus fort (200 \times 1, fig. 5) on voit l'aspect évolutif de ces cavités, situées presque au contact des meninges corticales.

Or, ces formations cavitaires, dont l'origine dégénérative et inflammatoire ne fait aucun doute, impliquent une réaction défensive et réparatrice, dont les tissus environnants sont le principal point de départ. Cette réaction se traduit par une néoformation vasculaire de capillaires à endothéliums volumineux, s'entourant de cellules mésogliques. Ces cellules, que nous désignerons par les termes de cellules granulo-adipeuses (selon la terminologie de del

Rio Hortega [11]), se multiplient « à vue d'œil », se détachent des capillaires néoformés, se libèrent et viennent flotter dans le liquide exsudatif qui remplit la cavité. La figure 6 donne une idée des détails de ce processus, que nous avons représenté également dans les schémas I et II.

Les éléments mésogliques en question, que l'on peut voir dans



FIG. 5. — Souriceau 1715. Sacrifié le cinquième jour. Hématoxyline ferrique. (Gross. : 200 \times 1.) Cavitation intense dans la zone corticale. En a : méninges. En b : centre de la cavitation.

la figure 7, se multiplient par voie de cinèse, ainsi que l'indiquent les images 1 à 4 du schéma I. Ils sont pourvus d'un, et, parfois, de deux noyaux, habituellement excentriques, et d'un cytoplasme vacuolaire. Certaines des vacuoles cytoplasmiques renferment des inclusions basophiles et des dérivés lipidiques, résultant de la désintégration myélinique de la substance blanche.

Ce sont là les trois phases du processus cœlogénétique provoqué par le virus B dans l'encéphale des souriceaux, et cela

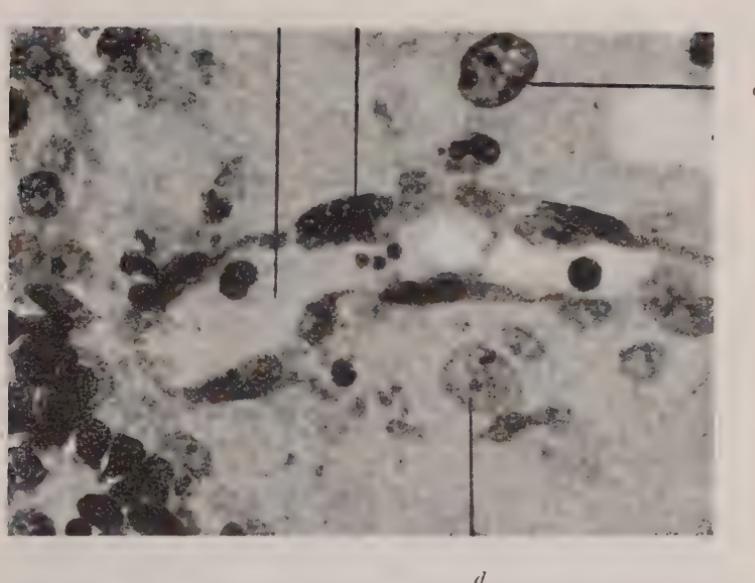


FIG. 6. — Souriceau 1712. Sacrifié le cinquième jour. Hématoxyline ferrique + rouge neutre. (Gross. : 1 400 \times 1) Corne d'Ammon, au voisinage d'une cavité. En a : vaisseau néoformé. En b : endothélium vasculaire. En c et d : noyaux de cellules granulo-adipeuses se détachant de la paroi du capillaire.

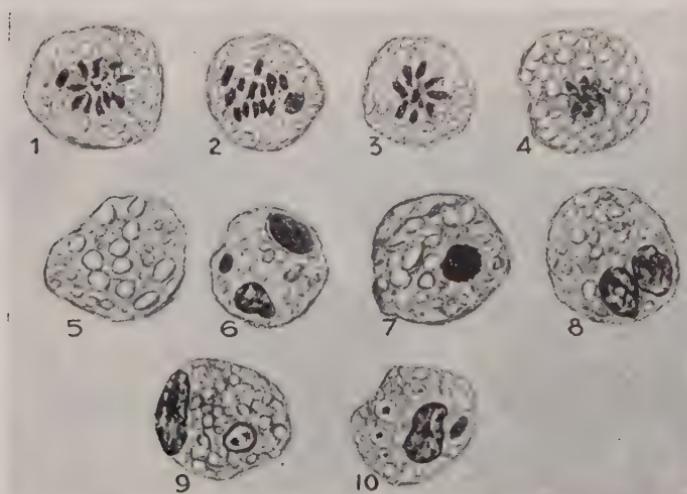


SCHÉMA I. — Mêmes souriceaux que ceux des figures 1 à 7. De 1 à 4, cellules mésogliaques en voie de cinèse; 5, élément mésoglique à cytoplasme vacuolaire; 6, même élément avec inclusions cytoplasmiques volumineuses; 7, même élément à noyau particulièrement basophile; 8, même élément à deux noyaux excentriques; 9 et 10, cellules mésogliaques avec des va-veoles cytoplasmiques contenant des inclusions. Hématoxyline ferrique. (Gross. : 1 000 \times 1.)



SCHÉMA II. — Mêmes souriceaux que ceux des figures 1 à 7. En 1 : vaisseau capillaire (v), avec son endothélium (e) et des hématies (h), entouré de nombreux éléments mesoglyciques (c.g.). En 2 : une cellule granulo-adipeuse (c.g.) au contact de la paroi d'un capillaire (v) contenant des hématies (h). En 3 : même aspect. En 4 : vaisseau capillaire (v) avec son endothélium (e) et des hématies (h), entouré de deux éléments mesoglyciques (c.g.); p, polynucléaires en voie de lyse; n, noyau neuronique. Hématoxyline ferrique. (Gross. : 1 000 \times 4.)

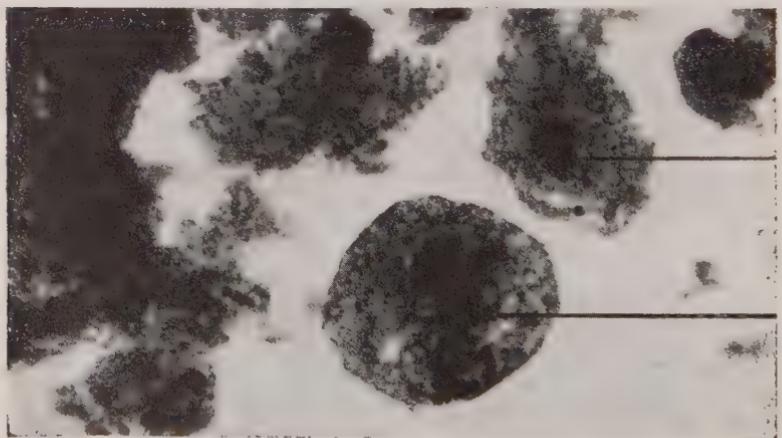


FIG. 7. — So riceau 1715 Sacifié le cinquième jour. Hématoxyline ferrique. (Gross. : 1 400 \times 1.) Centre d'une cavité. En a : cellule granulo-adipeuse binucléée. En b : même cellule mononucléée.

avec une rapidité étonnante, soit : 1^o phase dégénérative ; 2^o phase inflammatoire d'origine vasculaire ; 3^o phase de libération de la mésoglie dans le contenu liquide des cavités.

Cœlogénèse d'ultravirus autres que le type B Coxsackie, à savoir ceux de l'herpès et de l'encéphalite du Renard.

A. VIRUS HERPÉTIQUE. — Il est classique d'admettre que des cavités encéphaliques prennent naissance au cours de l'évolution de l'herpès cérébral chronique, et cela chez les animaux qui survivent et ont acquis un état réfractaire, ou chez ceux qui succombent après autostérilisation [42]. Nous en avons maintes fois exposé les caractéristiques histo-pathologiques, entre autres lors de notre Rapport : *Les ultravirus provoquateurs d'ectodermoses neurotropes*, présenté au Congrès international de Microbiologie de Paris, en 1930 [43]. Les images (4) figurant dans ce rapport sont fort ressemblantes à celles concernant la cœlogénèse du virus Coxsackie type B. Même cavitation et présence identique de cellules mésogliques granulo-adipeuses vacuolaires au sein des cavités. Le processus histogénétique est semblable dans les deux cas, mais la différence entre ces cœlogénèses, celle de la souche B et celle de l'herpès, est considérable, en ce sens que dans l'encéphalite herpétique il s'agit de *lésions cavitaires tardives*, cependant que dans le cas du virus Coxsackie neurotrophe on est en présence de *modifications tissulaires éminemment précocees, rapidement progressives, mortelles et sans aucun rapport avec un état immunitaire quelconque*.

B. VIRUS DE L'ENCÉPHALITE DU RENARD (Cf. C. Levaditi, Lépine et Schoen [44]). — La figure 8 donne une idée de la névraxite provoquée chez le Renard par le virus agent étiologique de cette encéphalite. Le rôle des éléments mésogliques dans la genèse des cavités, leur prolifération ayant, pour origine, la néoformation vasculaire, leur structure vacuolaire, leurs inclusions, y apparaissent nettement. Donc, même processus dans l'encéphalite du Renard et dans l'herpès chronique.



Une notion essentielle se dégage de l'ensemble de ces constatations (5), à savoir que l'affinité élective des ultravirus est intimement liée non seulement à des systèmes tissulaires, en fonction de leur origine embryogénétique, mais encore, sinon

(4) Voir nos travaux antérieurs [43 et 44].

(5) Et d'autres similaires.

plus, à des catégories données de cellules entrant dans la constitution de ces systèmes, soit, en ce qui concerne le névraxe central, les *neurones* (d'origine ectodermique), les *astrocytes* (même origine), la *mésoglie* (de nature mésodermique [del Rio Hortega]) et l'*oligodendroglie* (d'origine ectodermique [même auteur]). Ainsi que nous l'écrivions dans le Rapport cité ci-dessus, « ce



FIG. 8. — *Encéphalite du renard*. Ecorce cérébrale. Mobilisation et hypertrophie des éléments mésogliaques. Formation de cellules granulo-adipeuses à cytoplasme vacuolaire. Cœlogénèse. (Giemsa. Gross. : 600 X 1.)

dernier groupe de cellules (oligodendrogliales) est, selon del Rio Hortega, constitué par des éléments satellites des fibres blanches du système nerveux central, équivalents des cellules de Schwann des nerfs périphériques. Leur fonction paraît double : d'une part, elles jouent le rôle d'organites de soutien et, d'autre part, elles exercent une action trophique sur l'élaboration des lipides destinés à se transformer en myéline et à revêtir l'axone (fig. 9) ».

Or, il nous a été donné d'établir une classification, tout au moins provisoire, des divers ultragermes neurotropes d'après leurs affinités électives à l'égard de ces quatre catégories d'éléments

cellulaires entrant dans la constitution du système nerveux central. Cette classification est la suivante :

1^o *Les ultravirus neurotropes parfaitement connus, provoateurs d'ectodermoses neurotropes transmissibles et inoculables, à affinité pour les neurones de la substance grise (virus neuronophiles), agents étiologiques des POLIONÉVRAXITES (encéphalites, herpès,*



FIG. 9. — *Maladie de Schilder-Foix du singe. Phase évolutive de la démyélinisation. Volumineuses cellules oligodendrogliales contenant des dérivés lipidiques (promyéline). Trois astrocytes vacuolisés. Hématoxyline ferrique. (Gross. : 1 000 X 1.)*

maladie de Borna, poliomyélite, rage, Theiler, fièvre aphteuse neurotropes, etc.) ;

2^o *Les ultravirus (pour la plupart non encore isolés) à affinité élective pour les éléments de la série mésoglique et surtout oligodendrogliale (ectodermoses de la substance blanche, leuconévraxites [sclérose multiple et disséminée, sclérose en plaques, maladie de Schilder-Foix, etc.]) ;*

3^o *Les ultravirus faisant transition entre ces deux groupes extrêmes, à la fois neuronophiles, mésogliophiles et, parfois,*

oligodendrophiles (herpès chronique, encéphalomyélite du Renard, encéphalopathies post-infectieuses), *ultravirus irrégulièrement transmissibles expérimentalement*.

Sans nul doute c'est à cette dernière catégorie qu'appartient la souche neurotrophe de virus Coxsackie. Une comparaison entre les altérations encéphaliques provoquées par cet agent pathogène et celles observées dans l'herpès chronique et la maladie du Renard, autorise pleinement cette conclusion. Le rôle important joué par les éléments granulo-adipeux mésogliques et la réaction inflammatoire vasculo-formative qui leur donne naissance lors de la genèse des cavités (signe distinctif des propriétés cœlogénétiques du virus B) en constitue la preuve la plus convaincante.

Conclusions générales.

Le type encéphalitogène B de virus Coxsackie présente à la fois des affinités électives à l'égard des éléments nobles (neurones) du névraxe central des souriceaux, des cellules mésogliques (mésoglie) et, à un moindre degré, de l'oligodendroglie. Ses propriétés cœlogénétiques sont à la base de la formation des cavités qui apparaissent au cours de l'évolution éminemment rapide du processus infectieux.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] DALLDORF et SICKLES. *Science*, 1948, **108**, 61 ; *Bull. N. Y. Acad. Med.*, 1950, **26**, 329. Cf., pour l'ensemble du problème, l'éditorial du *Brit. Med. J.*, 1950, n° 4637, 233.
- [2] DALLDORF, SICKLES, PLAGER et GIFFORD. *J. exp. Med.*, 1949, **89**, 567.
- [3] MELNICK, SHAW et CURNEN. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1949, **71**, 344.
- [4] HOWITT. *S. E. Branch Soc. Amer. Bact.*, 4 novembre 1949.
- [5] ARMSTRONG et coll. *Canad. J. Publ. Health*, 1950, **41**, 51.
- [6] C. LEVADITI. Un nouvel ultravirus (Coxsackie) associé à celui de la poliomyélite. *La Semaine des Hôpitaux de Paris*, 1950, **26**, 4541.
- [7] DALLDORF et SICKLES. *Science*, 1948, **108**, 61.
- [8] DALLDORF. *Fed. Proc.*, 1950, **9**, 569.
- [9] DALLDORF. *Bull. N. Y. Acad. Med.*, 1950, **26**, 329.
- [10] MELNICK. *Bull. N. Y. Acad. Med.*, 1950, **26**, 342.
- [11] DEL RIO HORTEGA. *Memorias della Real Sociedad Espanola de Historia natural*, 1938, **14**, 7.
- [12] Voir à ce sujet : C. LEVADITI, P. LÉPINE et R. SCHOEN. *Ces Annales*, 1929, **43**, 1465.
- [13] C. LEVADITI. *Ces Annales*, 1930, **45**, 673.
- [14] C. LEVADITI, P. LÉPINE et R. SCHOEN. *C. R. Soc. Biol.*, 1929, **100**, 1007.

**SUR LES MODIFICATIONS *IN VIVO*
DES CARACTÈRES DE QUELQUES VIBRIONS
ISOLÉS DES EAUX
EN PÉRIODE D'ÉPIDÉMIE DE CHOLÉRA**

par J. GALLUT (*).

(Institut Pasteur.)

En 1938, un auteur chinois, Yu [1], ayant isolé des eaux de rivière à Shanghai, durant une épidémie de choléra, des vibrions non cholériques, a rapporté à leur sujet un fait très important.

Yu a signalé, en effet, qu'après cinq passages en mucine par la Souris (inoculation intrapéritonéale et isolement par culture du sang du cœur), un certain nombre de ces vibrions avaient acquis les caractères sérologiques du *V. cholerae* authentique. Sur 20 vibrions des eaux inoculés, 16 étaient devenus agglutinables par un sérum anticholérique « O », partiellement il est vrai, mais à des taux assez élevés allant jusqu'à 1 p. 1 280 dans un cas. Les caractères biochimiques de ces vibrions, toutefois, n'avaient pas suivi en général une transformation analogue, sauf en ce qui concerne le pouvoir hémolytique qui avait disparu chez tous.

Yu a tiré de ses expériences des conclusions susceptibles de modifier les notions admises sur l'épidémiologie du choléra, en général, et à Shanghai en particulier : la transformation possible des vibrions des eaux en vibrions cholériques, attribuée à l'influence de la mucine, devrait, selon cet auteur, se produire spontanément chez l'homme, « spécialement dans les cas avec troubles intestinaux où les substances mucoïdes peuvent être abondantes », et expliquer ainsi l'éclosion des épidémies de choléra sans apport extérieur de vibron cholérique.

Les faits signalés par Yu n'ont, à notre connaissance, jamais été confirmés. Ayant à notre disposition quelques vibrions isolés d'eaux douces et salées à Ismailia en 1947 durant la dernière épidémie de choléra en Egypte, c'est-à-dire des souches comparables à celles utilisées par Yu, nous avons tenu à reproduire ses expériences.

(*) Société française de Microbiologie, séance du 10 mai 1951.



Les vibrions utilisés, au nombre de 7, avaient à leur isolement (Dr Raynal) des caractères différents, tant biochimiques que sérologiques, ne permettant sûrement pas de les identifier au *V. cholerae*, non plus que de les classer dans un groupe homogène. Toutefois, il avait été possible de déceler chez certains d'entre eux un ou plusieurs facteurs « O » mineurs non spécifiques [2] du groupe cholérique, et de mettre en évidence, par ailleurs, chez 6 de ces 7 souches, une certaine coagglutinabilité.

Ces souches ont été conservées dans notre laboratoire à la température ambiante sur gélose profonde en tubes scellés pendant trois ans avec repiquages bisannuels.

Au début de nos expériences, leurs caractères biochimiques et sérologiques ont été vérifiés à nouveau et ont montré des variations notables sur plusieurs points (voir tableau), bien que ces vibrions ne puissent aucunement être considérés comme ayant varié spontanément vers la forme typique de *V. cholerae*.

EXPÉRIENCES DE PASSAGE SUR L'ANIMAL. — Comme Yu, nous avons utilisé la Souris blanche d'un poids moyen de 20 g ; toutefois, nous avons tenu à effectuer, outre les passages de vibrions en mucine, des passages témoins de vibrions sans mucine et à augmenter le nombre des passages eux-mêmes, soit dix au lieu de cinq.

La culture de chaque souche, récoltée sur gélose nutritive de pH 8 après vingt heures à 37°, a été mise en suspension en eau physiologique et injectée dans le péritoine de la Souris sous un volume de 0,5 cm³ à une dose suffisante pour amener la mort en vingt-quatre à trente-six heures.

Pour chaque passage, nous avons utilisé 2 lots de 2 Souris : le premier lot recevant la suspension microbienne en eau salée simple et le deuxième lot recevant la même suspension additionnée de 4 parties de mucine à 5 p. 100.

Comme il est de règle, les doses minima mortelles ont été plus fortes pour les vibrions non additionnés de mucine, mais, contrairement à ce que signale Yu, il nous a toujours été possible de tuer les Souris au premier passage avec une dose représentant 1/4 de la culture sur un tube de gélose inclinée (diamètre 18 mm). Cette dose a pu être abaissée jusqu'à 1/50 de culture au dixième passage. Pour les vibrions additionnés de mucine, les doses respectives des premier et dixième passages ont été de 1/60 et 1/200 de culture.

Le sang des Souris prélevé par ponction du cœur a été ensemençé dans l'eau peptonée hypersalée de Genevray et Bruneau [3], qui facilite grandement l'isolement du vibrion et permet le plus souvent son repiquage direct en culture pure sur gélose.

Après chaque passage, l'agglutination des vibrions a été recherchée avec un sérum anticholérique « O » spécifique (A) et un sérum (n° 145) préparé avec le vibrion d'eau Ez₅ CP, pour lequel nous avions trouvé antérieurement (1948) une communauté antigénique de 6 souches sur 7.

Les caractères biochimiques recherchés ont été ceux requis pour l'identification du vibrion cholérique, c'est-à-dire la réaction du choléra roth, la recherche de l'hémolyse, la protéolyse, le test d'Heiberg (action sur le saccharose, le mannose et l'arabinose) et la réaction de Voges Proskauer (acétylméthylcarbinol).

RÉSULTATS.

1^o CARACTÈRES SÉROLOGIQUES. — Indiquons d'abord qu'en aucun cas nous n'avons pu constater chez les vibrions des eaux ayant subi dix passages par la Souris avec ou sans mucine, l'apparition d'un facteur cholérique spécifique A, ni même des facteurs majeurs B ou C.

Après le dixième passage, les vibrions inoculés en eau salée simple avaient apparemment conservé leur constitution antigénique initiale ; ce fait a pu être vérifié pour 4 souches agglutinables à l'origine par le sérum 145. Par contre, les vibrions inoculés en présence de mucine ont tous perdu très rapidement (du troisième au sixième passage) leur agglutinabilité avec le sérum 145 (voir tableau).

2^o CARACTÈRES BIOCHIMIQUES. — Comme Yu, nous avons pu constater une modification des caractères biochimiques des vibrions ayant subi des passages par la Souris.

Le tableau indiquant les résultats des différentes réactions montre, comme nous l'avons indiqué plus haut, que la seule conservation en gélose profonde produit des variations de même ordre, qui se manifestent avec une extrême irrégularité.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS.

Du point de vue sérologique, il nous a donc été impossible, après dix passages sur la Souris de 7 vibrions d'eaux en présence de mucine, de confirmer les résultats rapportés par Yu avec 16 vibrions sur vingt, et seulement cinq passages.

Il est possible que les vibrions utilisés par Yu, qui montraient parfois « une trace d'agglutination » avant tout passage par la souris, aient contenu certains facteurs « O » mineurs non spécifiques de groupe cholérique qui correspondaient à des agglutinines non spécifiques du sérum anticholérique utilisé. Nous avons déjà signalé des cas semblables [2] précisément sur des vibrions non cholériques isolés en Egypte en 1947.

Variations des caractères des vibrions des eaux.

SOUCHES (1)	AGGLUTINATION (2)		CHOLERAOTÉ	HÉMOLYSE	PROTEOLYSE	HEIBERG (3)	VOGTS-PROSKAUER
	A	145					
Ea 2 ci.	1947	0	1 000	++	++	I	
	1951	0	0	—	—	III	
	10°S	0	1 000	—	—	I	
	10°M	0	0	—	—	III	
Ea 3 ci.	1947	0	5 000	—	—	III	
	1951	0	1 000	—	—	h.c.	
	10°S	0	500	—	—	III	
	10°M	0	100	—	—	II	
Eu 5.	1947	0	500	++	++	I	
	1951	0	0	++	++	VI	
	10°S	0	0	++	++	III	
	10°M	0	0	++	++	I	
Ez 1 ci.	1947	0	0	++	++	I	
	1951	0	100	++	++	V	
	10°S	0	0	++	++	III	
	10°M	0	0	++	++	I	
Ez 4 ci.	1947	0	5 000	++	++	III	
	1951	0	100	++	++	h.c.	
	10°S	0	500	++	++	III	
	10°M	0	0	++	++	I	
Ez 5 ci.	1947	0	2 000	++	++	I	
	1951	0	0	++	++	III	
	10°S	0	0	++	++	III	
	10°M	0	0	++	++	I	
Ez 5 cp.	1947	0	5 000	++	++	I	
	1951	0	500	++	++	VI	
	10°S	0	1 000	++	++	III	
	10°M	0	0	++	++	I	

(1) 1947, souche à son isolement; 1951, souche au début des expériences; 10°S, souche ayant passé dix fois par la souris en eau salée simple. 10°M, souche *idem* + mucine

(2) A, sérum anticholélique spécifique; 145, sérum anti-Ez 5 cp.

(3) Les chiffres romains indiquent le groupe de la classification de Heiberg; h.c., hors classification.

La signification de ces facteurs est encore discutée [4, 5, 6], mais leur présence dans des vibrions banaux ne saurait, en aucun cas, faire porter le diagnostic de vibron cholérique authentique.

Du point de vue biochimique, par contre, nous avons noté des variations des caractères analogues à celles décrites par l'auteur chinois. Toutefois, de telles variations se produisent également dans le cas de vibrions inoculés sans mucine, et aussi, spontanément par simple conservation des souches en milieux usuels. Elles sont, en outre, le plus souvent désordonnées ; on ne saurait donc en tirer aucune conclusion valable sur le rôle joué par le passage *in vivo*, pas plus que sur l'action de la mucine.

Du reste, le groupe des vibrions des eaux est considéré généralement comme dépourvu de toute homogénéité et l'absence de fixité de ses caractères est une raison supplémentaire de l'impossibilité d'opérer une classification valable de ces micro-organismes.

Aucun argument en faveur de la transformation éventuelle du vibron des eaux en vibron cholérique, à la faveur du passage par la souris en présence de mucine ne saurait donc être retenu de nos expériences. Tout au plus peut-on attribuer à l'action de la mucine une dégradation antigénique de ces vibrions qui n'apparaît pas dans les expériences témoins effectuées avec les suspensions microbiennes en eau salée simple.

A notre avis, rien n'autorise donc à accepter les conclusions de Yu en matière d'épidémiologie du choléra, ni à modifier les conceptions généralement admises selon lesquelles une épidémie découle toujours d'un cas humain endémique ou importé.

Un argument supplémentaire contre l'hypothèse de Yu nous est donné précisément par la situation épidémiologique actuelle de Shanghai. En effet, du fait de son isolement géographique prolongé, dû aux guerres et au blocus, le choléra a complètement disparu de cette région depuis 1939 (1).

Il n'y a donc, du point de vue épidémiologique pur, aucune raison valable non plus de penser que la transformation éventuelle chez l'homme d'un vibron des eaux en *V. cholerae* ait jamais pu se produire à Shanghai même, ni vraisemblablement en aucune région.

RÉSUMÉ.

Le passage en mucine par la souris de vibrions isolés des eaux en période d'épidémie cholérique n'a pas permis de confirmer leur transformation en *V. cholerae* signalée par Yu. Les données classiques de l'épidémiologie du choléra restent donc valables.

(1) Communications verbales de nos collègues les Drs FOURNIER et CHABAUD, de l'Institut Pasteur de Shanghai.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] H. YU. *Far Eastern Assoc. of Trop. Med.*, C. R. X^e Congrès, Hanoï, 1940, **2**, 465.
- [2] J. GALLUT. *Ces Annales*, 1949, **76**, 122.
- [3] J. GENEVRAY et J. BRUNEAU. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **139**, 165.
- [4] W. BURROWS, A. N. MATHER, V. G. Mc GANN et S. M. WAGNER. *J. Infect. Dis.*, 1946, **79**, 168.
- [5] F. KAUFFMANN. *Acta path.*, 1950, **27**, 283.
- [6] A. WAHBA. *Ces Annales*, 1951, **80**, 639.

EFFETS ANALGÉSIQUES DES ADMINISTRATIONS RÉPÉTÉES DE BICHLORHYDRATE D'HISTAMINE CHEZ LE RAT

par J. JACOB, J. AMBRUS et C. AMBRUS.

(Institut Pasteur. Laboratoire de Pharmacodynamie.
Service de Chimie thérapeutique.)

Depuis les travaux classiques de Dale et Laidlaw [8] et de Lewis [21], plusieurs chercheurs se sont efforcés d'établir le rôle de l'histamine dans l'organisme normal et, en particulier, de savoir si on pourrait lui attribuer une fonction dans les mécanismes de la douleur.

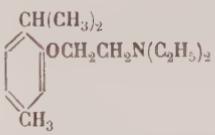
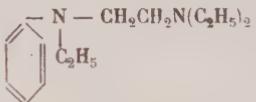
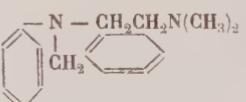
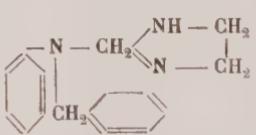
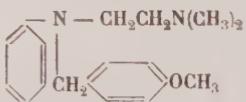
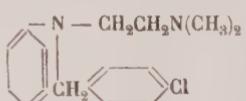
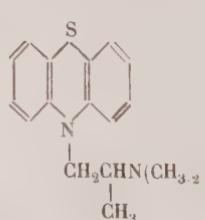
Rosenthal et ses collaborateurs [25] la considèrent comme l'excitant spécifique des récepteurs périphériques à la douleur, étayant leur hypothèse sur les arguments suivants : libération d'histamine au niveau de la peau et de la cornée à la suite de toute excitation douloureuse, action douloureuse de l'injection intradermique de très faibles doses d'histamine, analgésie « périphérique » provoquée par le 929 F.

Auparavant, Ungar [29] et Convard [6] avaient avancé des arguments indirects en faveur de l'existence de nerfs histaminergiques. Kwiatkowski [20], von Euler [12] et Werle et Weicken [30] ont précisé cette notion par des dosages d'histamine à différents niveaux du système nerveux. Le premier de ces auteurs a, en particulier, signalé la richesse en histamine des fibres nerveuses sensorielles venant de la peau et montré que la stimulation antidromique de nerfs sensibles libère de l'histamine. Kochtojants [19] a observé que la teneur en histamine des nerfs sensibles diminue à la suite d'un traumatisme crânien. Toutefois, selon Hellauer et Umrath [16], la substance extraite des racines postérieures de la moelle ne serait, ni de l'histamine, ni de l'acétylcholine.

Les expériences réalisées avec les antihistaminiques de synthèse n'ont pas contribué à éclaircir ce problème : les uns sont doués de propriétés analgésiques, les autres sont inactifs. Le tableau I résume les résultats dont nous avons connaissance.

Lorsqu'elles existent, les propriétés analgésiques de ces sub-

TABLEAU I. — Propriétés analgésiques des antihistaminiques de synthèse.

		ACTION analgésique	RÉFÉRENCE
929 F.		+	25
1571 F.		0	4
Antergan.		+	23
Antistine.		+	(4)
Néo-Antergan.		± ? 0	10 (4)
Synopen.		0	11
Phénergan.		0	(4)

(1) Expériences de ce Laboratoire, non publiées.

stances sont faibles et limitées. Rosenthal [25] qualifie l'analgésie par le 929 F de « périphérique » parce que l'animal ne réagit plus à la stimulation de la peau, mais bien à l'excitation directe des nerfs sensibles ; Parrot [23] a observé après Antergan la diminution de la sensibilité thermoalgésique chez l'Homme, mais aucune modification des réactions au pincement ou à la piqûre chez le Chien ; Dews et Graham [10], enfin, signalent l'action du Néo-Antergan mais précisent que le nombre de leurs observations ne permet pas une estimation statistique concluante.

Il n'y a pas non plus de parallélisme entre activité antihistaminique et pouvoir analgésique : en collaboration avec Lecannelier, nous avons recherché, sur le Rat, avec le test de Davies et coll. [9], l'action analgésique de l'Antistine, du Néo-Antergan et du Phénergan, et seul, le premier de ces corps, qui est l'antihistaminique le moins actif, avait une activité modérée ; les deux derniers étaient inefficaces à doses directement subtoxiques.

D'autre part, les propriétés anesthésiques locales des antihistaminiques de synthèse sont bien connues, mais les auteurs qui les ont étudiées avec quelque détail (Halpern, Perrin et Dews [15], Reuse [24], Loew [22]) considèrent qu'elles ne sont pas en rapport avec leur pouvoir antihistaminique. Enfin, l'inhibition par le bichlorhydrate d'histamine de l'action anesthésique locale de la pyribenzamine ou de la procaine (Barany et Nordqvist [2]) résulte, non pas d'un antagonisme spécifique, mais de l'acidité de la solution histaminique (Cabrera et Thompson [5], Jacob et Lecannelier [17]).

Dans l'ensemble, on le voit, les propriétés des antihistaminiques de synthèse ne corroborent pas une théorie histaminique de la douleur. Toutefois, l'antagonisme de ces substances vis-à-vis des effets de l'histamine présente d'étranges lacunes dont Dale [7] a récemment traité et que divers auteurs (Jancso [18], Fabinyi et Szebehelyi [13], Bucher [3]) ont tenté de combler en recourant à la désensibilisation à l'histamine par l'histamine elle-même.

A l'occasion d'expériences entreprises pour définir ces phénomènes de désensibilisation, nous avons observé que, après un certain temps, les Rats semblaient accuser de moins en moins violemment la douleur aux injections quotidiennes de cette substance et nous avons pensé qu'il serait intéressant de mesurer les modifications de la sensibilité thermoalgésique provoquées par un pareil traitement.

TECHNIQUE.

Les Rats utilisés pesaient de 80 à 140 g.

Cinq groupes furent mis en expérience :

Le groupe I (19 animaux) reçut, chaque jour, pendant un mois,

des doses de bichlorhydrate d'histamine croissant de 5 à 40 mg s.-c. (1).

Le groupe *II* (9 Rats mâles) reçut 50 mg i.-p. le premier jour, puis 100 mg i.-p. quotidiennement les cinq jours suivants.

Le groupe *III* (11 Rats mâles) fut injecté avec 10 à 100 mg s.-c., puis i.-p., pendant huit jours.

Le groupe *IV* (9 Rats mâles) reçut 5 mg s.-c., chaque jour, pendant huit jours.

Le groupe *V* (10 animaux mâles), servant de témoin aux groupes *III* et *IV*, reçut, chaque jour, du ClNa à 9 p. 1 000.

Dans tous les cas la sensibilité thermoalgésique fut mesurée le matin, avant l'injection quotidienne d'histamine, c'est-à-dire vingt-deux à vingt-trois heures après l'injection du jour précédent.

Pour tous ces groupes, les mesures de sensibilité thermoalgésique ont été réalisées en exposant une petite surface de la queue à une source de chaleur constituée par un thermocautère de platine alimenté par un transformateur ; la queue du Rat était préalablement nettoyée avec de l'éther et séchée avec du coton. La réaction douloureuse se manifeste par l'agitation de l'animal qui retire vivement sa queue.

Nous avons ainsi déterminé :

a) *Le seuil de la réaction immédiate.* — Dans ce cas, le thermocautère, préalablement chauffé, était appliqué directement sur la queue du Rat. Les résultats sont exprimés par le potentiel minimum — lu en volts au transformateur — nécessaire pour provoquer la réaction douloureuse en un temps très bref (moins d'une seconde) ; nous avons considéré l'analgésie comme complète lorsque le Rat ne réagissait plus pour un potentiel de 12 volts.

b) *Le temps de réaction* (méthode de Davies, Ravenios et Walpole [9]). — Le voltage appliqué au thermocautère était constant (5 volts). Le filament de platine était seulement approché de la queue du Rat et maintenu à une distance très faible de l'organe grâce à un dispositif en amiante (plaque creusée d'une gouttière et percée d'un trou). Les temps de réaction sont exprimés en secondes et nous avons limité nos mesures à vingt secondes chez les Rats analgésiés, nos valeurs témoins et notre appareillage n'étant pas en tous points identiques à ceux de Davies et coll. qui interrompent leurs mesures après quinze secondes.

Pour le groupe *II* nous avons, en outre, utilisé la méthode de Sivadjian [28], test moins brutal que les précédents et qui recourt à l'électrisation des pattes de l'animal : les résultats sont

(1) Toutes les doses sont exprimées pour 100 g de poids d'animal.

exprimés en unités arbitraires proportionnelles à l'intensité du courant électrique produit par un chariot de Duboys Reymond.

La température fut mesurée avant et trente minutes après l'injection s.-c. de 5 mg d'histamine ; le thermomètre était introduit dans le haut côlon dont la vacuité était assurée par expression de son contenu. La température ambiante était approximativement de 20° C. Dans le cas du groupe *IV*, la dose hypothermante (5 mg s.-c.) était la dose « désensibilisante ». Pour les groupes *I* et *III* elle fut injectée après les déterminations de sensibilité thermoalgésique et avant la forte dose désensibilisante d'histamine.

RÉSULTATS.

Le tableau II montre les résultats obtenus avec le premier groupe d'animaux après trente jours de traitement et permet de les comparer avec ceux d'un lot témoin de même poids moyen.

Encore que l'analgésie ainsi obtenue fût modérée, elle n'en était pas moins statistiquement très significative ($P < 0,01$) et légitimait de nouveaux essais.

TABLEAU II.

	SEUIL DE LA RÉACTION (en volts)		TEMPS DE RÉACTION (en secondes)	
	Groupe I		Témoin	
Moyenne	7,7		4,9	
D. S.	2,26		1,47	
E. S.	0,52		0,34	
<i>t</i>	5			

$$(1) \text{ D. S. (déviation standard)} = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n-1}}. \quad \text{E. S. (erreur standard)} = \frac{\text{D. S.}}{\sqrt{n}}.$$

$$t \text{ (indice critique)} = \frac{m_x - m_y}{\sqrt{\frac{\sum d_x^2 + \sum d_y^2}{(n_x - 1) + (n_y - 1)} \cdot \frac{n_x + n_y}{n_x \cdot n_y}}}.$$

$$\text{Si } n_x = n_y, t = \frac{m_x - m_y}{\sqrt{\frac{\sum d_x^2 + \sum d_y^2}{n(n-1)}}}.$$

Dans ces expressions : m , moyenne ; d , déviation à partir de la moyenne ; n , nombre d'animaux : les indices x et y se rapportent respectivement aux animaux traités et aux animaux témoins.

La figure 1 illustre le développement progressif du phénomène

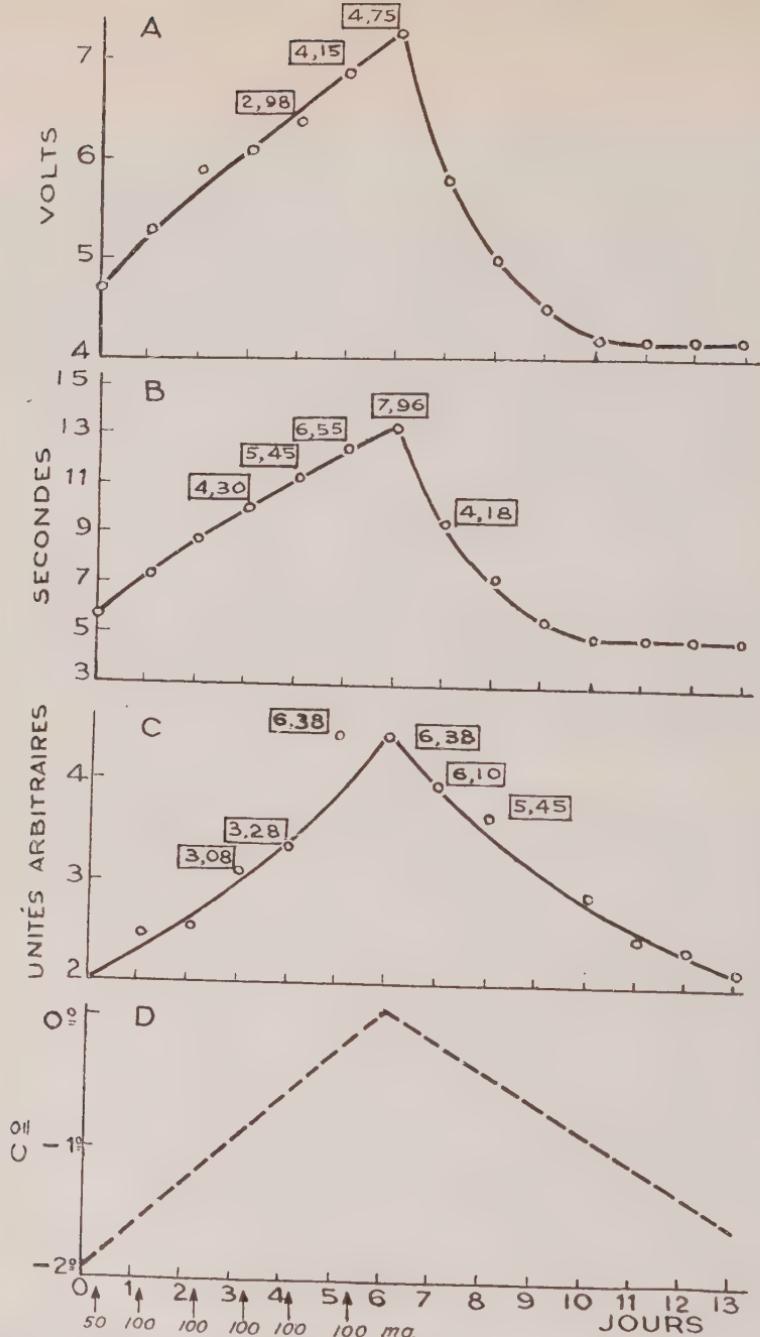


FIG. 1. — Développement et réversibilité de la thermoanalgesie provoquée par des injections quotidiennes de fortes doses de bichlorhydrate d'histamine chez le Rat (groupe II).

En ordonnées et de haut en bas : A, seuils de réaction en volts; B, temps de réponses en secondes; C, intensités d'électrisation en unités arbitraires; D, réponses hypothermiques à une faible dose d'histamine en centigrades.

En abscisses, le temps en jours, le jour de la première injection étant le jour 0.

Les valeurs encadrées, en regard de certains points, représentent les indices critiques calculés pour ces points selon la formule du tableau I, les témoins étant représentés par les animaux eux-mêmes avant le traitement.

Par souci de clarté, seuls les indices traduisant une probabilité égale ou inférieure à 0,01 ont été indiqués.

chez les Rats du groupe *II* (2). Rappelons que les mesures ont été réalisées chaque fois vingt-deux à vingt-trois heures après les injections de bichlorhydrate d'histamine et que, à ce moment, la motricité des Rats, leur température corporelle et leur comportement général étaient normaux : il ne s'agit donc pas d'un phénomène narcoleptique analogue à celui qu'ont observé Dale et Laidlaw [8] chez le cobaye et chez le chat après l'injection d'une dose unique et élevée d'histamine. On voit aussi que la suspension du traitement entraîne la rétrocession de l'analgésie qui perd rapidement tout caractère significatif ; la sensibilité est redevenue normale au dixième jour.

Le parallélisme des mesures effectuées, d'une part, au niveau de la queue du Rat et, d'autre part, au niveau des pattes (test de Sivadjian) montre que les actions locales hyperesthésiantes (Lewis et Hess [21]) et anesthésiantes (Sewitt [27]) des brûlures réalisées au niveau de la queue n'ont pas eu d'influence appréciable sur les résultats de nos mesures effectuées toujours en peau saine. La non-intervention de ces causes d'erreur est encore montrée par la réversibilité de l'analgésie et par la constance des mesures effectuées sur le groupe témoin (groupe *V* : fig. 2 et tableau III).

On remarquera aussi que les résultats furent le plus longtemps significatifs pour la méthode de Sivadjian (six jours), puis pour la méthode de Davies (quatre jours), puis pour celle des seuils (trois jours) : cette différence est vraisemblablement en rapport avec la sensibilité de ces méthodes, la première recourant à une simple électrisation des pattes, la seconde à un échauffement relativement modéré de la queue, la troisième enfin à une brûlure de cet organe.

Pour le groupe *II*, l'effet hypothermique de l'histamine fut seulement déterminé à trois reprises, c'est-à-dire avant, pendant et après le traitement : de 1,9° C, avant le traitement, il était aboli au sixième jour et redevenu pratiquement normal lorsque les animaux avaient recouvré leur sensibilité thermoalgesique.

Nous avons tenté de préciser les relations qui existaient entre l'évolution de l'hypothermie histaminique et celle de la thermoalgesie.

Les résultats obtenus avec les groupes *III*, *IV* et *V* sont représentés par la figure 2, et leur traitement statistique est résumé dans le tableau III. On y constate que la sensibilité thermoalgesique et l'hypothermie décroissent, dans l'ensemble, d'autant plus rapidement que la dose quotidienne administrée est plus élevée.

(2) Le traitement statistique de ces résultats a été résumé dans une note préliminaire (*Experientia*, 1950, 6, 272) et n'est pas reproduit ici par souci de concision.

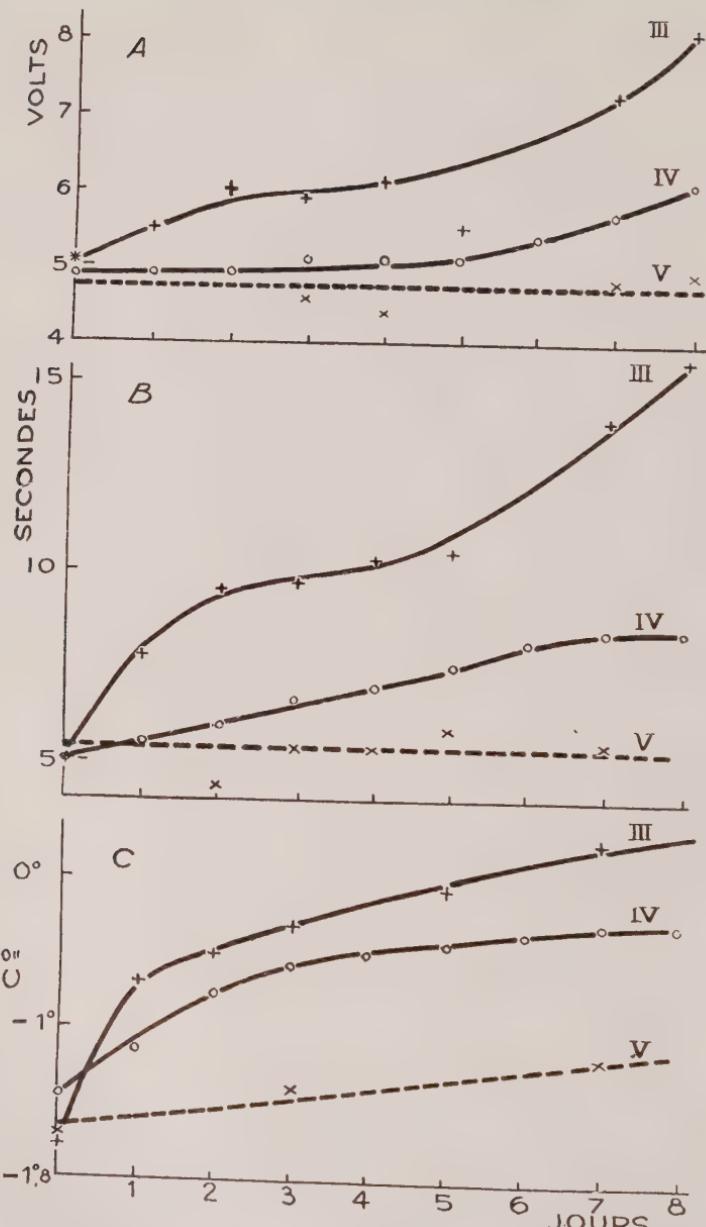


FIG. 2. — Modification de la sensibilité thermo algésique et de l'hypothermie histaminique chez des groupes de Rats soumis à des doses quotidiennes variables de bichlorhydrate d'histamine.

En ordonnées, de haut en bas : A, seuils de réaction (en volts); B, temps de réaction (en secondes); C, hypothermie histaminique (en centigrades).
 + --- +, groupe III (10 à 100 mg s.c., puis i. p., par jour); o --- o, groupe IV (5 mg s.c., par jour); x --- x, groupe V (témoins).
 En abscisses, le temps en jours (comme fig. 1).

TABLEAU III.

JOURS	SEUILS DE RÉACTION						TEMPS DE RÉACTION									
	Groupe III			Groupe IV			Groupe V (témoins)			Groupe IV			Groupe V (témoins)			
	<i>m</i>	E. S.	<i>t</i>	<i>m</i>	E. S.	<i>t</i>	<i>m</i>	E. S.	<i>t</i>	<i>m</i>	E. S.	<i>t</i>	<i>m</i>	E. S.		
0 . . .	5,4	0,4	0	4,9	0,20	0,19	5,4	0,41	4,9	0,63	0,62	4,9	0,26	4,43	5,4	0,61
1 . . .	5,5	0,46	1,34	4,9	0,16	0,22	5,4	0,41	7,7	0,76	1,09	5,5	0,47	0,48		
2 . . .	6	0,54	1,47	4,9	0,16	0,22	5,4	0,46	9,5	1,36	2,25	5,9	0,20	0	4,4	0,80
3 . . .	5,8	0,33	1,63	5,1	0,16	0	4,6	0,46	9,7	0,93	3,04*	6,6	0,17	0,86	5,3	0,54
4 . . .	6,2	0,46	2,02	5,1	0,16	0	4,4	0,46	10,3	0,64	4,65*	6,9	0,20	1,23	5,2	0,58
5 . . .	5,5	0,23	1,22	5,1	0,16	0	4,4	0,46	10,3	1,08*	3,49*	7,5	0,24	1,87	5,9	0,72
6 . . .				5,4	0,47	0,95	4,8	0,25	14	0,25	6,00*	8,4	0,33	2,57		
7 . . .	7,3	0,57	3,36*	5,7	0,22	1,79	4,8	0,25	15,5	0,21	8,99*	8,3	0,35	2,66	5,5	0,64
8 . . .	8,2	0,58	4,74*	6,1	0,23	2,92*	4,9	0,23	15,5	0,21	8,99*	8,3	0,34	2,72	5,4	0,48

(1) *m*, E. S. et *t* ont les mêmes significations que dans le tableau I.

Pour le calcul de *t*, les trois groupes de Rats ont été considérés comme des groupes indépendants ; dans ce cas, nous avons adopté pour les témoins, la moyenne quotidienne et la somme des carrés des déviations les moins favorables, c'est-à-dire les plus élevées.

Les comparaisons entre traîtes et témoins, jour par jour, ou les comparaisons des valeurs d'un jour déterminé avec celles du jour 0 pour le même groupe, fournissent des valeurs de *t* plus favorables encore.

$$P < 0,01.$$

Encore que les comparaisons soient malaisées, il semble bien que cette relation se vérifie si l'on considère les lots I et II par rapport au groupe *III* (tableau IV).

TABLEAU IV. — Comparaison des différents groupes.

GROUPES	POSÉOLOGIE (mg/100 g et par jour)	TEMPS (en jours) nécessaire pour :		
		la disparition de l'effet hypothermique	l'accroissement du seuil de réaction au-dessus de 7 volts	l'accroissement du temps de réaction au-dessus de 11 secondes
I	4 à 40 s.c.	15	± 30	± 30
II.	70 à 100 i. p.	6	4	6
III	10 à 100 s.c. puis i. p.	7	6	7
IV.	5 s.c.	> 8	> 8	> 8

Toutefois, les deux phénomènes ne sont pas strictement superposables : les deux courbes des hypothermies de la figure 2, nettement concaves vers le bas, montrent que la régression de cet effet est particulièrement rapide dans les tout premiers jours ; on ne retrouve cette allure, ni pour les courbes correspondantes de sensibilité douloureuse de la figure 2, ni pour celles du groupe *II* (fig. 1) qui sont, soit irrégulières, soit presque linéaires sur un assez long trajet.

On remarquera aussi que, pour le groupe *V*, considéré comme témoin mais ayant reçu une dose hypothermante d'histamine au début de l'expérience et aux troisième et septième jours, l'hypothermie tendit à décroître mais non la sensibilité thermalgésique.

Il est possible que ces différences résultent seulement des erreurs des méthodes utilisées et du fait que les relations, qui existent entre les mesures elles-mêmes et les phénomènes qu'elles chiffrent, ne sont probablement pas identiques dans l'un et l'autre cas.

DISCUSSION.

Des administrations quotidiennes de bichlorhydrate d'histamine à doses relativement élevées provoquent, chez le Rat, une thermalgésie croissant progressivement. Cet effet, comme la disparition de l'hypothermie histaminique, fut d'autant plus rapide que la posologie fut plus élevée, et il rétrocéda dès la cessation du traitement. Son existence pourrait être considérée comme un argument en faveur d'une théorie histaminique de la douleur.

Pour cela, il faudrait toutefois admettre qu'un traitement prolongé par de fortes doses de bichlorhydrate d'histamine n'a pas d'autres conséquences que d'inhiber les réactions — expérimentales ou naturelles — à l'histamine.

En 1946, Feinberg [14] s'est précisément élevé contre pareille opinion après avoir passé en revue les effets, expérimentaux et cliniques, des administrations répétées d'histamine. A notre connaissance, la spécificité de la « désensibilisation » histaminique n'a pas été fermement établie depuis cette date. Certes, l'hypothermie et le bronchospasme acetylcholinique ne sont pas modifiés chez des Souris, des Rats ou des cobayes désensibilisés [2, 13, 1], mais ce n'est là qu'un aspect très fragmentaire de la question. D'autre part, Schild considère que l'inhibition d'un phénomène histaminique par l'histamine [26] elle-même *au niveau d'un organe isolé* est l'un des antagonismes les plus spécifiques qu'il soit possible de concevoir : en effet, dans ce cas, l'histamine inhibante est avant tout fixée sur les récepteurs à l'histamine. Ce raisonnement ne peut être appliqué à la désensibilisation d'un animal entier que si cette désensibilisation est d'origine tachyphylactique, ce qui devrait être démontré.

L'analgésie que nous avons observée ne peut donc être interprétée simplement à l'heure actuelle, et il appartiendra à de nouvelles expériences d'en préciser la signification.

RÉSUMÉ.

Si on administre quotidiennement, à des Rats, du bichlorhydrate d'histamine à doses comprises entre 5 et 100 mg s.-c., pendant six jours à un mois, il apparaît une thermo-analgésie qui progresse d'autant plus rapidement que la dose quotidienne est plus élevée. Cette analgésie peut devenir très intense, mais elle rétrocède dès la cessation du traitement.

Cette diminution de la sensibilité thermoalgesique évolue, d'une façon générale, comme la diminution de la réaction hypothermique à l'histamine ; le parallélisme n'est toutefois pas absolu.

Il n'est pas possible de savoir actuellement si cette thermo-analgésie est une manifestation de désensibilisation histaminique et son existence ne peut encore être considérée comme un argument en faveur d'une théorie histaminique de la douleur.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. AMBRUS, C. AMBRUS et J. JACOB. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1951, **86**, 350-362.
- [2] E. BARANY et P. NORDQVIST. *Nature*, 1949, **164**, 701.

- [3] K. BUCHER. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1949, **79**, 336-342.
- [4] H. B. BURCHELL et R. L. VARCO. *J. Pharmacol.*, 1942, **75**, 1-5.
- [5] G. CABRERA et J. E. THOMPSON. *Nature*, 1950, **165**, 681.
- [6] R. CONJARD. *Bull. Acad. Méd.*, 1947, **131**, 510-512 ; *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141**, 611-613.
- [7] H. H. DALE. *Brit. med. J.*, 1948, **2**, 281.
- [8] H. H. DALE et P. P. LAIDLAW. *J. Physiol.*, 1910-1911, **41**, 318-344.
- [9] L. DAVIES, J. RAVENTOS et A. L. WALPOLE. *Brit. J. Pharmacol.*, 1946, **1**, 255-264.
- [10] P. B. DEWS et J. D. P. GRAHAM. *Brit. J. Pharmacol.*, 1946, **1**, 278-285.
- [11] R. DOMENJOZ et R. JAQUES. *Schweiz. med. Woch.*, 1949, **79**, 276-289.
- [12] U. S. von EULER. *J. Physiol.*, 1948, **107**, 10 p. — U. S. von EULER et A. ASTRÖM. *Acta Physiol. Scand.*, 1948-1949, **16**, 97-104. — U. S. von EULER. *Acta Physiol. Scand.*, 1950, **19**, 85-93.
- [13] M. FABINYI et J. SZEBEHELYI. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1947, **75**, 402-411 ; *Acta Allerg.*, 1949, **2**, 233-244.
- [14] S. H. FEINBERG. *J. Am. med. Assoc.*, 1946, **132**, 702-713.
- [15] B. N. HALPERN, G. PERRIN et P. B. DEWS. *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141**, 1125-1128 ; *Sem. Hôpital. Paris*, 1948, **24**, 2561-2564.
- [16] H. HELLAUER et K. UMRATH. *Pflüger's Arch.*, 1948, **249**, 619-630.
- [17] J. JACOB et S. LECANNELIER-RIVAS. *C. R. Soc. Biol.*, 1950, **144**, 920-922.
- [18] N. JANCZO. *Nature*, 1947, **160**, 227-228.
- [19] K. S. KOCHTOYANTS, D. E. RYVKINA et R. L. MITRIPOLITANSKAYA. *C. R. Acad. Sci. U. R. S. S. (Chem. Abstr.)*, **40**, 6645.
- [20] H. K. KWIATKOWSKI. *J. Physiol.*, 1943, **102**, 32.
- [21] T. LEWIS et W. HESS. *Clin. Sc. Inc. Heart*, 1933, **1**, 39 ; 1936, **2**, 373. — T. LEWIS et E. E. POCHIN. *Clin. Sc. Inc. Heart*, 1937, **3**, 67.
- [22] E. R. LOEW. II^e Congrès Internat. de Thérapeutique, Bruxelles, 10-11 juin 1949.
- [23] J. L. PARROT. *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 620-621.
- [24] J. J. REUSE. *Brit. J. Pharmacol.*, 1948, **3**, 174-180.
- [25] S. R. ROSENTHAL et D. MINARD. *J. exp. Med.*, 1939, **70**, 415-425. — S. R. ROSENTHAL et BROWN. *J. Immunol.*, 1940, **38**, 259-265. — D. MINARD et S. R. ROSENTHAL. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1940, **44**, 237-239. — E. LAMBERT et S. R. ROSENTHAL. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1943, **52**, 302-304. — S. R. ROSENTHAL, D. MINARD et E. LAMBERT. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1943, **52**, 317-320.
- [26] H. O. SCHILD. *Proceed. Roy. Soc. Med.*, 1949, **42**, 623-625.
- [27] S. SEWITT. *J. Path. a. Bact.*, 1949, **61**, 427-442.
- [28] J. SIVADJIAN. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1936, **52**, 142-147.
- [29] G. UNGAR. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **118**, 620-622. — G. UNGAR et J. L. PARROT. *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **131**, 1165-1166.
- [30] E. WERLE et G. WEICKEN. *Biochem. Zeitschr.*, 1949, **319**, 457-462.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU MÉCANISME
DE LA RÉDUCTION DES NITRATES EN NITrites
PAR QUELQUES GERMES ISOLÉS DU SOL.
MISE AU POINT
D'UN DOSAGE BIOLOGIQUE DES NITRATES

par J. KAUFFMANN (*).

(*Institut Pasteur [Service de Microbie technique]
et Office de la Recherche scientifique outre-mer
[Laboratoire de biologie des sols].*)

Le mécanisme de la réduction des nitrates en nitrites a suscité de nombreux travaux.

En 1910, Beijerinck et Minkman [1] remarquèrent que les bactéries dénitritifiantes exigent la présence d'un composé organique agissant comme donneur d'hydrogène pour la réduction des nitrates.

La réduction des nitrates semble nécessiter la présence d'au moins deux systèmes enzymatiques distincts (Quastel, Stephenson et Wethan (1925) [2], la nitratase d'*E. coli* que Stickland (1931) [3] décrivit comme très sensible à l'oxygène et l'enzyme réducteur des bactéries dénitritifiantes peu sensible à l'oxygène.

Meiklejohn (1940) [4], cultivant des *Pseudomonas* sur milieu synthétique dans des conditions bien déterminées, montra que la dénitritification, aussi bien en aérobiose qu'en anaérobiose, exige des substances organiques appropriées.

Prévot et Enescu (1946) [5] remarquèrent que *Welchia perfringens*, en présence de glucides, réduit les nitrates en nitrites quand le glucose a été remplacé par du galactose ou du glycérol (qui apporte moins d'hydrogène). En bouillon VF glucosé à 2 p. 1 000 on ne peut observer qu'une destruction totale ou partielle des nitrates, mais à aucun moment on ne peut saisir le stade nitrite. Cela tiendrait à la richesse du milieu en donneur d'hydrogène tant du côté des acides aminés très abondants dans le milieu VF que du côté du glucose qui est un donneur généreux.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 7 juin 1951.

Nous avons recherché la cause de l'augmentation de production des nitrites à partir des nitrates par addition de lactate dans certains milieux de culture ensemencés avec des germes oligonitrophiles isolés du sol (non identifiés), dénommés respectivement souches G et H [6]. Cette recherche a nécessité un dosage des nitrates dans les différents milieux de culture. A cet effet, nous avons réalisé un dosage biologique des nitrates à l'aide d'une troisième souche isolée du sol (souche E) [6].

1^o DOSAGE BILOGIQUE DES NITRATES. — Ce dosage est basé sur le fait que la réduction des nitrates en nitrites est quantitative dans un milieu ammoniaco-nitrique ensemencé avec la souche E.

On dose NO_2 provenant de la réduction de NO_3 par le réactif de Griess à l'aide de l'électrophotomètre.

A noter que cette souche utilise NO_2 pour ses synthèses, lorsque tout l'azote ammoniacal a été utilisé [6].

Cette méthode permet de faire des dosages de nitrates dans les milieux les plus complexes contenant de l'azote nitreux, ammoniacal et aminé avec une sensibilité de l'ordre de 0,01 μg de NO_3 par centimètre cube de milieu.

Expérience. — Les milieux de culture suivants contenant exactement 0,1 g p. 100 de NO_3K sont répartis dans des tubes à essai à raison de 10 cm^3 de milieu par tube.

(On marque d'un trait de lime sur les tubes le niveau des milieux de culture.)

1^o Milieu de Winogradsky glucosé [7] + 0,1 p. 100 de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.

2^o Bouillon de viande + 0,1 p. 100 de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.

3^o Eau peptonée simple + 0,1 p. 100 de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.

4^o Milieu VF + 0,1 p. 100 de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.

Les tubes à essai sont stérilisés, puis ensemencés avec la souche E. On porte à l'étuve à 34°, en chambre humide, de façon à éviter l'évaporation des milieux de culture. On dose tous les deux jours la quantité du NO_2 formé. Après chaque opération on marque d'un trait de lime sur le tube à essai, le nouveau niveau du milieu de culture. On s'assure ainsi que l'évaporation au cours de la culture est nulle. En cas de variation de volume, on ramène au volume initial avec de l'eau distillée stérile. Après quinze jours à l'étuve, on remarque que la quantité de NO_2 dans les différents milieux de culture a atteint son maximum et que cette valeur reste constante pendant onze jours. Par ailleurs, la réaction à la diphenylamine sulfurique est négative après destruction du NO_2 par l'urée et l'acide sulfurique.

Cette teneur maximum en NO_2 dans les milieux de culture correspond, aux erreurs d'expériences près, à la totalité des nitrates ajoutés dans le milieu, réduits en nitrites. On trouve les mêmes

résultats en opérant sur les milieux au bouillon, eau peptonée et milieu VF nitratés à 0,1 g p. 100, mais non additionnés de sulfate d'ammonium.

Ce germe utilise donc de préférence, pour ses synthèses, l'azote ammoniacal et aminé à l'azote nitreux.

2^o ACTION DU LACTATE SUR LA RÉDUCTION DES NITRATES. — Le dosage biologique des nitrates étant au point, nous avons recherché l'influence du lactate sur la réduction des nitrates par les souches G et H dans différents milieux de culture. Dans ce but nous avons fait l'expérience suivante :

Le milieu de Winogradsky, glucosé, contenant 0,1 g p. 100 de NO_3K est réparti dans des tubes à essai à raison de 9 cm³ de milieu dans chaque tube. On complète à 10 cm³ en ajoutant 1 cm³ des différents milieux organiques suivants : milieu à l'eau peptonée, au bouillon VF et asparagine (solution à 3 p. 100). On prépare ainsi deux lots. Dans un lot, on ajoute II gouttes d'une solution de lactate de calcium à 10 p. 100 stérilisée à part. On ensemence et on porte à l'étuve à 34° en chambre humide. Les nitrites sont dosés tous les jours.

Au cours de cette expérience, aucune production de NO_2 n'a été observée dans les cas suivants :

Souche H en milieu VF ;

Souche H en milieu VF + lactate.

Faible production de NO_2 (environ 2 µg par centimètre cube) pour la souche G sur milieu à l'asparagine (avec et sans addition de lactate), aucune trace à partir du sixième jour de culture.

Production de 3 à 5 µg de NO_2 par centimètre cube de milieu, seulement le troisième et le quatrième jour de culture, pour la souche G sur milieu VF (avec et sans lactate).

Pour les autres cas, les résultats sont résumés par les figures 1, 2 et 3.

Le dix-septième jour de culture on caractérise NO_3 dans les différents milieux de culture à l'aide de la diphénylamine sulfureuse après destruction du NO_2 . La réaction s'est montrée positive dans les milieux au bouillon, eau peptonée, VF (avec et sans addition de lactate) et dans le milieu à l'asparagine additionné de lactate ensemencés avec la souche G. La réaction s'est également montrée positive dans le milieu à l'asparagine (avec et sans addition de lactate) ensemencé avec la souche H.

Afin de connaître la quantité de NO_3 restant dans les différents milieux de culture présentant une réaction positive à la diphénylamine sulfureuse, nous avons pratiqué le dosage biologique à l'aide de la souche E qui, comme on vient de le constater, possède une réelle fonction de réduire quantitativement NO_3 en NO_2 .

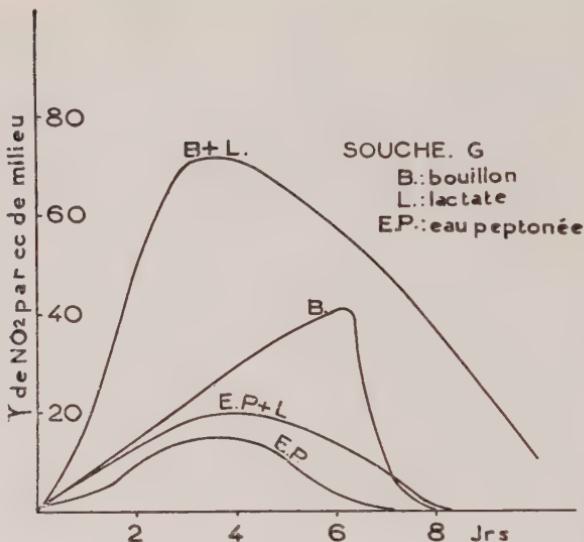


FIG. 1. — Action du lactate sur la production de NO_2 dans les milieux au bouillon et eau peptonée ensemencés avec la souche G.

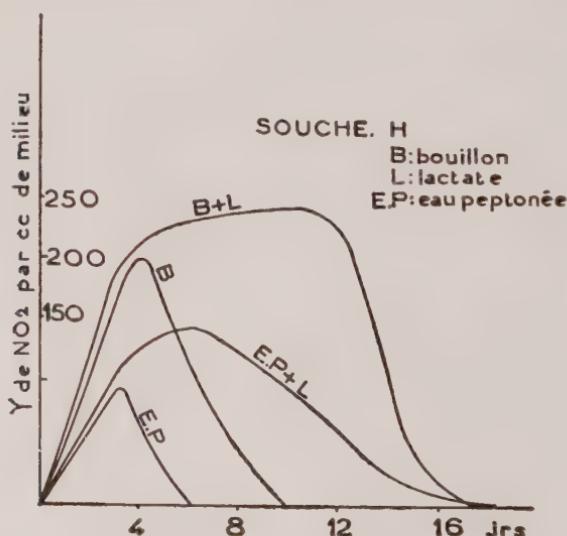


FIG. 2. — Action du lactate sur la production de NO_2 dans les milieux au bouillon et eau peptonée ensemencés avec la souche H.

Dans ce but, on marque d'un trait de lime sur les tubes le niveau des milieux de culture. On ajoute, dans chaque tube, III gouttes d'une solution de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ à 3 g p. 100. On stérilise trente minutes à 115°. S'il y a diminution de volume au cours de la stérilisation, on ramène au volume initial (indiqué par le trait de lime) avec de l'eau distillée stérile. On ensemence avec la souche E et on porte à l'étuve à 34° en chambre humide. On dose les nitrites formés tous les deux jours. Après huit jours on obtient une quantité maximum de nitrites qui se maintient

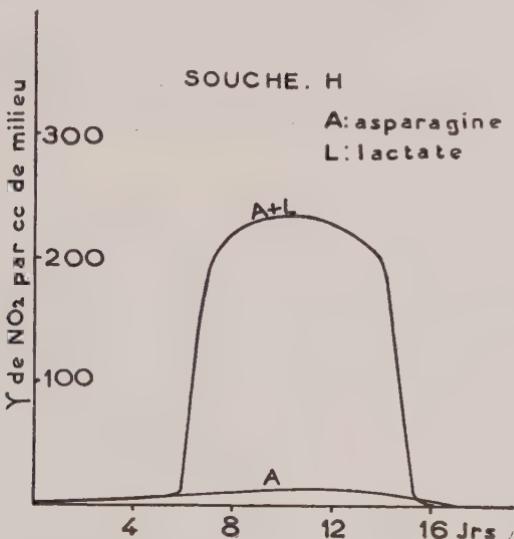
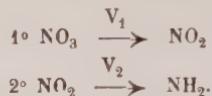


FIG. 3. — Action du lactate sur la production de NO_2 dans un milieu à l'asparagine ensemencé avec la souche H.

constante pendant plusieurs jours. La réaction à la diphenylamine est négative (après destruction des nitrites). A l'aide de cette méthode on constate que les milieux sans lactate, sont, en fin d'expérience, moins riches en nitrate que les milieux additionnés de lactate. On obtient les mêmes résultats en opérant sur le milieu de Winogradsky glucosé dont la source azotée est fournie sous forme de NO_3K à 0,1 g p. 100 et de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ à 0,1 g p. 100. (A noter que, dans ce milieu, avec ou sans addition de lactate, nous n'avons jamais observé de production de nitrites.)

Que peut-on conclure de ces résultats ? Il nous paraît tout d'abord utile de préciser les conditions indispensables pour la production de nitrites à partir des nitrates dans un milieu de culture.

On peut schématiser la réduction des nitrates comme suit :



La réaction 1^o comprend l'ensemble des réactions qui conduisent du stade NO_3 au stade NO_2 . Soit V_1 la vitesse de cette réaction, plus exactement ce sera la vitesse de la dernière réaction qui conduit au stade NO_2 .

La réaction 2^o comprend l'ensemble des réactions qui conduisent du stade NO_2 au stade NH_2 . Soit V_2 la vitesse de cette réaction : dans ce cas, ce sera la vitesse de la première réaction de réduction de NO_2 .

Il y aura accumulation de NO_2 dans le milieu de culture lorsque l'on aura :

$$V_1 > V_2.$$

L'addition de lactate dès le début de culture dans le milieu synthétique de Winogradsky (milieu ammoniaco-nitrique), ne donne aucune production de NO_2 . Le dosage biologique des nitrates restant dans le milieu de culture, révèle que la quantité de NO_3 utilisée est nettement inférieure dans le milieu au lactate que dans le milieu témoin sans lactate. Dans ces conditions, le lactate ne semble pas jouer le rôle de donneur d'hydrogène pour les nitrates. Il y a même effet contraire : V_1 a diminué par rapport au témoin.

Le lactate favorise la production de NO_2 dans les milieux au bouillon et eau peptonée ensemencés avec les souches G et H et sur le milieu à l'asparagine ensemencé avec la souche H.

Le dosage biologique des nitrates non utilisés, ainsi que l'examen des courbes permettent d'expliquer la cause de cette augmentation de NO_2 due au lactate.

On remarque, en effet, que la souche G en eau peptonée et au bouillon et la souche H sur milieu à l'asparagine utilisent moins de nitrate en présence de lactate. On peut donc écrire :

$$V_1 \text{ « lactate »} < V_1 \text{ « témoin »}.$$

(On suppose qu'il n'y a pas accumulation de corps intermédiaires entre NO_3 et NO_2 .)

L'augmentation de NO_2 dans le milieu ne peut donc provenir que d'une diminution de V_2 :

$$V_2 \text{ « lactate »} < V_2 \text{ « témoin »}.$$

L'examen des courbes relatives à la souche H ensemencée sur milieu au bouillon et eau peptonée permet également de conclure que l'augmentation de NO_2 produite par le lactate est due à une

diminution de V_2 par rapport au témoin. Le lactate, ici encore, ne joue pas le rôle de donneur d'hydrogène pour les nitrates. L'accumulation de NO_2 dans le milieu de culture est due, au contraire, à un freinage de la réaction $NO_2 \rightarrow NH_2$.

Il est à noter également l'influence des divers milieux organiques sur la réduction des nitrates en nitrites. Il y a forte production de NO_2 dans les milieux au bouillon, eau peptonée, VF et asparagine ensemencés avec la souche H. On constate une faible production avec la souche G ensemencée sur eau peptonée et bouillon. Production pratiquement nulle dans les milieux à l'asparagine et VF ensemencés avec G.

La souche E semble peu sensible aux différents milieux : Il y a forte production de NO_2 dans tous les milieux utilisés. La réduction des nitrates en nitrites est même quantitative lorsque le germe possède de l'azote ammoniacal ou aminé à sa disposition.

On peut en conclure que la réduction des nitrates en nitrites est un phénomène très complexe qui dépend de nombreux facteurs.

Il est difficile, sinon impossible, d'affirmer qu'un germe est ou n'est pas capable de réduire les nitrates. Un germe ensemencé dans un bouillon de viande, nitraté, pourra utiliser l'azote aminé de préférence à l'azote nitrique ; il pourra également se produire une réduction quantitative des nitrates en nitrites ; dans ce cas, on ne peut pas conclure, sur ce simple fait, que ce germe n'est pas capable d'utiliser les nitrites.

Par ailleurs, une forte production de nitrites à un moment donné, dans un milieu de culture, ne signifie pas obligatoirement une augmentation de réduction des nitrates, même si ce phénomène a lieu après addition dans le milieu de culture d'un donneur d'hydrogène tel que le lactate.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. W. BEIJERINCK et D. C. J. MINKMAN. *Zentralbl. Bakt.*, 1910, **25**, 30.
- [2] J. H. QUASTEL, M. STEPHENSON et M. D. WETHAM. *Biochem. J.*, 1925, **19**, 304.
- [3] L. H. STICKLAND. *Biochem. J.*, 1931, **25**, 1543.
- [4] J. MEIKLEJOHN. *Ann. Appl. Biol.*, G. B., 1940, **27**, 558.
- [5] A.-R. PRÉVOT et M. ENESCU. *C. R. Soc. Biol.*, 1946, **140**, 76.
- [6] J. KAUFFMANN. *Ces Annales*, 1950, **78**, 670 et *Thèse doct. ès sciences*, Paris, novembre 1950.
- [7] S. WINOGRADSKY. *Ces Annales*, 1926, **40**, 480.

RÉACTION ALLERGIQUE D'UNE VARIÉTÉ DE *Nicotiana tabacum* VIS-A-VIS DE LA MOSAÏQUE DU TABAC

par J. CUZIN, D. SCHWARTZ et C. BRETON (*).

(Service des Recherches biologiques du S. E. I. T. A., Paris.)

Au cours de recherches portant sur la susceptibilité comparée de diverses variétés de *Nicotiana tabacum* à la mosaïque du tabac, nous avons été amenés à étudier une variété nettement moins sensible (1) que les variétés habituellement cultivées (D. Schwartz et J. Cuzin, 1951 [1]). Cette variété, hybride stabilisé provenant du croisement des deux variétés Java Isère et Cabot (variété J. I. C.), est remarquable, non seulement par sa faible sensibilité à l'infection mosaïque, mais également par l'aspect particulier de sa symptomatologie.

On sait, en effet, que les divers génotypes du genre *Nicotiana* qui manifestent des symptômes à la suite d'une inoculation par le virus de la mosaïque, présentent l'un ou l'autre des deux types suivants de réponse : la réponse *focalisante* (lésions nécrotiques, limitées en principe à la zone inoculée) ou la réponse *généralisante*.

Or, nous avons indiqué (D. Schwartz et J. Cuzin, *loc. cit.*) que la variété J. I. C. présente à la fois les deux types de réponses : d'une part, en effet, des lésions nécrotiques apparaissent en premier lieu dans la plage inoculée, d'autre part le symptôme « green mottle » apparaît ensuite dans les diverses feuilles selon un tableau classique de réponse généralisante.

Cette existence des deux types de symptômes permet de poser un problème d'allergie qu'il serait difficile d'envisager dans le cas des variétés présentant un seul type de réponse : si on inocule une plante de la variété J. I. C. sur une de ses feuilles avec le

(*) Société française de Microbiologie, séance du 10 mai 1951.

(1) La sensibilité dont il est question ici ne se rapporte pas à l'intensité du symptôme, mais au taux de malades dans des conditions données de culture.

virus de la mosaïque, cette plante manifeste la réponse focalisante sur la feuille d'inoculation et la réponse généralisante sur l'ensemble de ses feuilles ; si on réinocule alors la plante, sur une autre feuille que lors de la première inoculation, cette feuille présentera-t-elle la réponse focalisante comme lors d'une première inoculation, ou bien la réponse sera-t-elle différente du fait de l'inoculation précédente ? Dans ce dernier cas, on aurait affaire typiquement à une réaction allergique (au sens étymologique de ce mot, selon von Pirquet).

Ce problème a fait l'objet d'une expérimentation dont les résultats sont indiqués ci-après. Cette expérimentation n'a porté que sur un très petit nombre de plantes, mais vu la constance et la netteté des résultats obtenus, une enquête numériquement plus importante et d'esprit statistique ne nous a pas semblé nécessaire.

I. — RÉACTION DU SUJET A LA RÉINOCULATION.

L'expérience a porté sur 10 plantes de la variété J. I. C., aussi comparables que possible, choisies dans une même parcelle de culture. Lors d'une première inoculation, on a laissé indemnes 5 d'entre elles (plantes *témoins*), tandis que les 5 autres étaient inoculées (plantes *inoculées*) dans des conditions standardisées au maximum (feuilles d'inoculation comparables, même mode d'inoculation, etc.).

Les 5 plantes inoculées manifestèrent, d'une part le symptôme focalisant six jours après l'inoculation, sur la feuille inoculée, puis le symptôme généralisant, qui commença par l'apparition du « green mottle » sur les feuilles jeunes quinze jours après l'inoculation. A cette date, on procéda, avec la même souche de virus, à même concentration, à une nouvelle inoculation, qui porta cette fois sur les 10 plantes. Chez les 5 plantes malades, elle porta sur 2 feuilles, distinctes de la feuille inoculée la fois précédente, et choisies comme suit : d'une part, une feuille jeune présentant nettement le symptôme du « green mottle », et, d'autre part, une feuille plus basse ne présentant pas encore de symptômes. Ainsi avait-on affaire, en définitive, à trois catégories de feuilles inoculées (à raison de 5 feuilles par catégorie) : les feuilles des pieds témoins, les feuilles « sans symptômes » des pieds malades, et les feuilles « avec symptômes » des pieds malades. Ces trois catégories de feuilles furent examinées les jours suivants, pour permettre une lecture comparative du nombre des lésions apparues. Deux modes opératoires furent d'ailleurs utilisés : pour chaque catégorie, 3 feuilles furent normalement laissées sur pied, tandis que les 2 autres feuilles furent prélevées, et maintenues en survie au laboratoire.

Le tableau I indique les nombres de lésions observés :

TABLEAU I.

CATÉGORIE	NOMBRE DE LÉSIONS					
	Feuilles maintenues sur pied		Feuilles prélevées		Total	
Pieds témoins (non inoculés précédemment)	61	234	140	26	5	466
Pieds précédemment inoculés :						
Feuilles sans symptômes	41	49	19	10	7	96
Feuilles avec symptômes.	7	0	2	1	0	10

L'examen de ces chiffres permet de dégager des conclusions très nettes :

1^o En comparant la ligne 1 aux lignes 2 et 3, on constate que le nombre de lésions diminue considérablement quand on passe des pieds témoins aux pieds ayant subi la première inoculation.

Le fait de la première inoculation abaisse ainsi de façon considérable l'intensité de la réponse focalisante à une nouvelle inoculation : *la réponse de la plante est donc allergique*.

2^o En comparant les lignes 1 et 2, on est en présence de feuilles qui, au moment de la deuxième inoculation, étaient d'apparence semblable (absence de symptômes) et dont cependant les nombres de lésions sont très différents. Mais, malgré la similitude d'aspect, les feuilles de ces deux catégories étaient différentes du point de vue pathologique, les premières appartenant à des pieds sains et les secondes à des pieds malades ; de fait, malgré l'absence de symptômes, les feuilles de la catégorie 2 contenaient du virus (comme on a pu le constater par des frictions de contrôle sur des feuilles de *Nicotiana glutinosa*).

Il semble donc que le phénomène d'allergie soit lié directement à la présence du virus, même en l'absence des symptômes de maladie : il pourrait, dans ce sens, permettre de déceler la présence du virus avec plus de sensibilité ou de précocité que ne permet la seule lecture des symptômes. Cette possibilité sera envisagée plus loin.

3^o La décroissance du nombre des lésions de la première à la troisième ligne rend vraisemblable l'hypothèse d'une relation quantitative entre l'intensité du phénomène allergique et la quantité du virus présent dans la feuille.

II. — REPÉRAGE DU VIRUS PAR LA RÉACTION ALLERGIQUE.

Les résultats énoncés ci-dessus montrent que si on inocule une feuille de la variété J. I. C., le nombre des lésions produites décèle de façon probablement quantitative la présence de virus dans la feuille au moment de l'inoculation, le nombre de lésions variant en sens inverse de la quantité de virus présente dans la feuille.

Nous avons tenté d'utiliser ce « repérage » pour suivre le mouvement du virus dans la plante à partir de la plage inoculée. Il semble établi que si on inocule une plage limitée d'une feuille, le virus, après un temps de localisation, et sans doute de multiplication dans cette plage, gagne ensuite rapidement la nervure de cette feuille, puis la tige, et apparaît en des points de la plante très éloignés de la feuille inoculée (soit l'extrémité supérieure, soit l'extrémité inférieure de la plante, soit les deux, selon les auteurs), les feuilles comprises entre ces extrémités et la feuille d'inoculation restant indemnes. C'est à partir de ces extrémités, vraisemblablement après y avoir subi une phase de multiplication importante, que le virus envahirait successivement les diverses feuilles, en se rapprochant de la feuille inoculée, qui ne serait finalement envahie que par cette propagation secondaire et non à partir de la plage inoculée.

Nous avons utilisé notre méthode de repérage de la façon suivante : 3 plantes de la variété J. I. C. ont été inoculées une première fois sur une plage limitée d'une feuille ; puis, dix jours plus tard, c'est-à-dire trois jours avant l'apparition des symptômes généralisants, alors qu'aucune feuille ne présentait encore de tels symptômes, les plantes ont été réinoculées sur toutes leurs feuilles et sur toute la surface de celles-ci. Des lésions nécrotiques apparaissent alors sur ces feuilles cinq jours plus tard ; le tableau II indique le nombre des lésions apparues sur les diverses feuilles, celles-ci étant comptées à partir de la feuille inoculée la première fois, positivement vers le haut et négativement vers le bas.

L'examen de ces chiffres montre que :

1^o Les feuilles ne donnant pas de lésions à la réinoculation sont celles des extrémités supérieure et inférieure de la plante, ce qui concorde bien avec le fait que le virus envahirait d'abord ces feuilles.

2^o Le nombre de lésions à la réinoculation est d'autant plus petit que les feuilles sont plus proches des extrémités de la plante. Ce gradient apparaît nettement lorsque, dans le tableau II, on groupe les feuilles, par exemple, en classant la population des feuilles supérieures à la feuille d'inoculation en trois groupes contenant chacun un tiers des feuilles, et de même pour les feuilles inférieures. Le nombre moyen de lésions par feuille dans chacun

TABLEAU II.

NUMÉRO D'ORDRE de la feuille compté à partir de la feuille inoculée la première fois	NOMBRE DE LÉSIONS A LA RÉINOCULATION		
	1 ^{re} plante	2 ^e plante	3 ^e plante
+ 12	0		
+ 11	0		
+ 10	0		2
+ 9	0		1
+ 8	0		4
+ 7	10		18
+ 6	17	1	6
+ 5	13	3	30
+ 4	46	11	20
+ 3	28	39	38
+ 2	29	51	4
+ 1	34	97	34
Feuille inoculée :			
— 1	64	44	0
— 2	51	44	18
— 3	12	39	39
— 4	0	69	18
— 5	2	68	9
— 6	0	0	10
— 7	0	7	0
— 8		0	0
— 9			0

de ces groupes est inscrit au tableau III. Il montre nettement que le nombre de lésions est d'autant plus petit que les feuilles sont plus proches des extrémités de la plante, ce qui concorde, dans l'hypothèse d'un repérage quantitatif, avec le fait que le virus envahirait successivement les diverses feuilles à partir des extrémités de la plante vers la feuille inoculée.

TABLEAU III.

NUMÉRO DU GROUPE de feuilles à partir de la feuille inoculée la première fois	NOMBRE MOYEN DE LÉSIONS par feuille à la réinoculation.		
	1 ^{re} plante	2 ^e plante	3 ^e plante
+ 3	0	2	3
+ 2	10	25	18
+ 1	34	74	25
Feuille inoculée			
— 1	52	30	74
— 2	4	34	42
— 3	0	3	0

La concordance ainsi observée semble bien confirmer, à la fois les hypothèses actuellement admises sur le mouvement du virus dans la plante, et l'hypothèse d'une corrélation négative entre la quantité de virus présente et le nombre de lésions produites après réinoculation.

RÉSUMÉ.

Lorsqu'on inocule le virus de la mosaïque du tabac à une plante de la variété J. I. C. (hybride stabilisé issu du croisement des deux variétés *Java Isère* et *Cabot de Nicotiana tabacum*), la plante répond d'abord par des lésions nécrotiques dans la plage inoculée, puis, sur l'ensemble de la plante, par les symptômes généralisants classiques chez *Nicotiana tabacum*. Si on réinocule ensuite la plante sur une autre feuille avec la même souche de virus, il apparaît, sur la plage nouvellement inoculée, des lésions nécrotiques en nombre beaucoup moindre que lors d'une première inoculation : ce comportement peut être considéré comme allergique ; cette réponse allergique est probablement quantitative, le nombre de lésions de seconde inoculation diminuant, toutes choses égales d'ailleurs, en fonction de la quantité de virus présente à la suite de la première inoculation. Cette diminution permettrait ainsi de repérer quantitativement la présence du virus en une région donnée de la plante. Cette méthode, appliquée à la recherche du mouvement du virus dans la plante à partir de la plage inoculée, a donné des résultats conformes aux hypothèses actuellement admises.

BIBLIOGRAPHIE

[1] D. SCHWARTZ et J. CUZIN. *Ann. Inst. Exp. Tabac Berg.*, 1951, 4, n° 2 (sous presse).

**SUR LA VARIATION DE LA TENEUR EN LIPIDES
DU BACILLE TUBERCULEUX,
EN FONCTION DE L'AGE DE LA CULTURE**

par J. ASSELINEAU.

(Institut de Biologie physico-chimique, Paris.)

Ainsi qu'il a été récemment souligné par Nègre [1], les bacilles tuberculeux de souches virulentes présentent, lorsqu'ils sont très jeunes, une acido-résistance nulle et une virulence faible. Cet auteur a constaté dans le cas de cultures de bacilles sur milieu de Sauton, que la virulence et l'acido-résistance semblent apparaître à partir du sixième jour. Il vient d'être, en outre, signalé [2] que les bacilles très jeunes de souches virulentes se colorent en jaune par la réaction au rouge neutre de Dubos et Middlebrook [3], et ne présentent la coloration rouge caractéristique des bacilles virulents qu'après plusieurs jours.

Il était donc particulièrement intéressant de rechercher les différences de composition pouvant exister entre les lipides isolés de bacilles jeunes (cultures de quatre ou cinq jours) et ceux isolés de bacilles âgés (cultures de quatre ou six semaines), d'autant plus que H. Bloch [4] n'a pu isoler une fraction toxique qu'il appelle « cord factor » qu'à partir de bacilles jeunes.

Utilisant la technique d'extraction fractionnée d'Anderson [5], nous avons isolé les diverses fractions lipidiques de bacilles de la souche humaine *Test* et de BCG, cultivés sur milieu de Sauton. Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le tableau ci-après.

Ce tableau montre que les bacilles très jeunes sont caractérisés par une teneur beaucoup plus faible en lipides, ce fait étant encore plus accentué pour les bacilles humains que pour le BCG. Jusqu'à présent, l'existence d'une telle différence de teneur en lipides entre bacilles jeunes et bacilles âgés n'avait été avancée, à notre connaissance, que comme hypothèse pour expliquer, par exemple, la différence de résistance de ces bacilles vis-à-vis de l'acide sulfurique [1].

Il est à remarquer que les bacilles jeunes contiennent déjà autant de *phosphatides* que les bacilles âgés, sous une forme apparemment identique (similitude des propriétés physiques) ; or,

TABLEAU I. — Teneur en lipides de bacilles de la souche humaine virulente *Test* et de BCG, en fonction de l'âge de la culture.

	SOUCHE				
	Test		BCG		
	Age de la culture				
	5 jours	42 jours	4 jours	28 jours	42 jours
Fractions lipidiques isolées, en p. 100 du poids sec des bacilles :					
1. Graisse soluble dans l'acétone	2,7	7,3	5,2	8,8	10,9
Acides gras libres, en p. 100 de la graisse	15,3	33,0	15,0	31,4	36,9
2. Fraction phosphatidique	0,5	0,8	0,8	0,5	0,4
Point de fusion	195-205°	200-210°	190-210°		200-205°
Phosphore p. 100	2,5	2,7	2,4		2,4
3. Cires extraites par l'alcool-éther (cires A)	2,3	4,2	2,7	1,7	1,7
Point de fusion	36-41°	48-54°	36-38°		34-38°
Acidité (mm ³ de KOH N/10 par milligramme)	0,5	4,3	0,8		1,0
4. Cires extraites par le chloroforme	1,6	9,2	1,3	9,4	9,0
Point, lipo-polysaccharide	0,08	6,2	0,06		1,6
Point de fusion	190-200°	200-210°	150-170°		140-170°
Lipides libres totaux	7,1	21,5	10,0	20,4	22,0

rappelons qu'à la suite des travaux de Sabin [6], on a voulu attribuer une grande importance à cette fraction dans la genèse de la lésion tuberculeuse.

Au contraire, les cires (extraites par le chloroforme) semblent s'élaborer plus lentement au cours de la croissance du bacille. Asselineau et Lederer [7] ont montré antérieurement la présence dans ces cires d'un lipo-polysaccharide, dont la constitution chimique est très voisine de celle du « Pmko » de N. Choucrout [8]. Dans les bacilles très jeunes, nous avons retrouvé une telle fraction lipo-polysaccharidique, mais en proportion très faible (voir tableau).

Les graisses du bacille tuberculeux renferment une proportion importante d'acides gras libres [9]; l'examen de notre tableau montre que cette teneur est beaucoup moins importante chez les bacilles jeunes; elle reste encore faible chez les bacilles provenant de cultures de BCG âgées de quinze jours (16 p. 100 de fraction acide par rapport à la graisse brute). De même, nous avons été incapable de mettre en évidence de l'acide mycolique

libre dans les bacilles *Test* de cinq jours, alors que nous en avons isolé à partir de bacilles de quarante-deux jours, de la même souche [10] (ainsi d'ailleurs qu'à partir de bacilles âgés de souches humaines virulentes Aeschbacher et H-37 Rv). C'est l'absence de cet acide libre qui cause la différence d'acidité et de point de fusion des cires A (1) de bacilles *Test* avec l'âge (voir tableau). La richesse des cultures de bacilles tuberculeux âgés en acides gras libres pourrait s'expliquer soit par un processus physiologique normal, soit par une autolyse de bacilles morts.

D'après ces résultats, la fraction phosphatidique ne semble pas être un facteur important dans la virulence du bacille tuberculeux, puisque des bacilles très jeunes, peu virulents, en renferment autant que des bacilles âgés virulents. D'ailleurs, la formation de cellules géantes n'est pas l'apanage des phosphatides et de l'acide phthioïque qu'ils renferment, car d'autres fractions lipidiques, telles que les acides mycoliques [11] ou les lipo-polysaccharides [12], possèdent aussi cette propriété. Au contraire, la faible teneur en « cires » que nous avons observée chez les bacilles très jeunes est en accord avec une intervention possible de ces substances dans le phénomène de la virulence (peut-être par l'intermédiaire de la fraction lipo-polysaccharidique [13]) et de l'acido-résistance (en modifiant la perméabilité de la paroi cellulaire).

Il serait possible d'expliquer la plus faible virulence des bacilles jeunes par un empêchement de leur multiplication dans l'organisme, par suite d'une immobilisation par des processus phagocytaires. En effet, il vient d'être montré [14] que le lipo-polysaccharide Pmko, ainsi que d'ailleurs les bacilles tuberculeux virulents (H-37 Rv), inhibent le chimiotactisme des leucocytes, tandis que des bacilles avirulents (H-37 Ra), où la fraction lipo-polysaccharidique semble absente [7], produisent une inhibition nettement moins marquée. Des bacilles très jeunes pourraient donc présenter une faible inhibition du chimiotactisme leucocytaire, en raison de leur faible teneur en lipo-polysaccharide. L'action toxique de la fraction phosphatidique pour les leucocytes, observée par Wartman et Ingraham [15], devrait jouer un rôle secondaire en raison de la faible teneur des bacilles en cette fraction.

Asselineau et Lederer [7] ont rendu responsables de la coloration des bacilles virulents par le rouge neutre, selon Dubos et Middlebrook [3], la fraction lipo-polysaccharidique et l'acide mycolique libre. L'existence d'une très faible teneur en lipo-

(1) Nous désignons par « cires A » les cires isolées, à côté de la fraction phosphatidique, de l'extrait à l'alcool-éther, pour les distinguer des cires extraites par le chloroforme.

polysaccharide et l'absence d'acide mycolique libre chez les bacilles très jeunes sont en accord avec cette explication de la réaction au rouge neutre, puisque Viallier, Kalb et Tigaud [2] ont observé que les bacilles très jeunes se colorent comme les bacilles avirulents.

RÉSUMÉ. — Nous avons comparé la teneur en lipides de cultures jeunes (quatre ou cinq jours) de bacilles tuberculeux (souche humaine *Test* et BCG), et celle de bacilles âgés (quatre ou six semaines).

La teneur en lipides libres totaux n'est que de 7 à 10 p. 100 du poids sec des bacilles jeunes, au lieu de 20 à 22 p. 100 chez les bacilles âgés.

Les bacilles jeunes présentent sensiblement la même teneur en fraction phosphatidique que les bacilles âgés. Au contraire, leur teneur en « cires » est beaucoup plus faible.

Nous discutons l'incidence de ces résultats sur les problèmes de la virulence et de l'acido-résistance du bacille tuberculeux, et sa coloration par le rouge neutre.

Nous remercions la Fondation Waksman pour le développement des études microbiologiques en France, pour une subvention (attribuée au laboratoire de E. Lederer) ayant facilité notre travail. Nous remercions également M. le professeur J. Tréfouël, directeur de l'Institut Pasteur, et M. le Dr J. Bretey, chef de service, qui nous ont fourni les cultures de bacilles utilisées dans ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] L. NÈGRE. *Les lipoïdes dans les Bacilles tuberculeux et la Tuberculose*, Masson édit., Paris, 1950.
- [2] J. VIALLIER, J. C. KALB et J. TIGAUD. *C. R. Soc. Biol.*, 1950, **144**, 1513.
- [3] R. J. DUBOS et G. MIDDLEBROOK. *Am. Rev. Tub.*, 1948, **58**, 698.
- [4] H. BLOCH. *J. exp. Med.*, 1950, **91**, 197.
- [5] R. J. ANDERSON. *J. Biol. Chem.*, 1927, **74**, 525.
- [6] F. R. SABIN, C. A. DOAN et C. E. FORKNER. *J. exp. Med.*, 1930, **52**, suppl. 3.
- [7] J. ASSELINÉAU et E. LEDERER. *C. R. Acad. Sci.*, 1950, **230**, 142.
- [8] N. CHOUCROUN. *Am. Rev. Tub.*, 1947, **56**, 203.
- [9] J. A. CROWDER, F. H. STODOLA, M. C. PANGBORN et R. J. ANDERSON. *J. Am. Chem. Soc.*, 1936, **58**, 636. — N. FETHKE. *Les lipoïdes du Bacille tuberculeux*. Herman édit., Paris, 1938, 31. — J. ASSELINÉAU. *Thèse Doctorat ès sciences*, Paris. 1950.
- [10] J. ASSELINÉAU et E. LEDERER. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1949, **31**, 492.
- [11] P. GERSTL, R. TENNANT et O. PELZMAN. *Am. J. Path.*, 1945, **21**, 1007.

- [12] A. DELAUNAY, J. ASSELINEAU et E. LEDERER. *C. R. Soc. Biol.*, 1951, **145**, 650.
- [13] J. ASSELINEAU et E. LEDERER. *Experientia*, 1951, **7**, 281.
- [14] N. CHOUCROUN, A. DELAUNAY, S. BAZIN et R. ROBINEAUX. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **232**, 1325.
- [15] W. B. WARTMAN et E. S. INGRAHAM. *Arch. Path.*, 1940, **29**, 773.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.*)

Séance du 5 Juillet 1951.

Présidence de M. GASTINEL

COMMUNICATIONS

RAGE CLINIQUE EXPÉRIMENTALEMENT CONSTATÉE CHEZ UN LAPIN DOMESTIQUE

par P. REMLINGER et J. BAILLY.

(*Institut Pasteur du Maroc, Tanger.*)

Bien que très réceptif au virus rabique, le lapin ne figure guère qu'à titre d'accident de laboratoire dans la longue liste des animaux dont les morsures sont justiciables du traitement pasteurien. Le fait paraît dû moins au faible risque qu'il court d'être mordu qu'à la forme paralytique exclusivement réalisée chez lui par la maladie. De là l'intérêt présenté par un lapin atteint dans un clapier domestique d'une rage furieuse expérimentalement démontrée. Nous devons cette observation, unique croyons-nous dans la littérature médicale, à l'amabilité de M. le Dr Saillard, vétérinaire inspecteur de l'Elevage à Taza, qui nous l'a signalée et a bien voulu se prêter avec l'un de nous à une minutieuse expertise.

Il s'agit d'un lapin mâle de race commune, blanc et noir, âgé de 11 mois, né dans un clapier d'une douzaine de congénères où, depuis sa naissance, il n'a cessé de vivre au milieu de toute sa famille. Ce clapier est situé à Taza dans un jardin entourant la villa d'un colonel, villa édifiée elle-même dans la zone suburbaine, en bordure d'un champ d'orge. Ce clapier est constitué par une grande cage en bois et en grillage, aménagée sur un sol en terre battue creusée de nombreuses galeries. Les lapins peuvent y trouver un abri contre la chaleur mais elles sont, ainsi que le fait a été constaté *de visu*, fréquentées par de nombreux rats qui, du reste, pullulent aux environs. Trois chiens griffons enfermés dans un chenil individuel et vaccinés contre la rage n'ont aucun accès possible à ce clapier, dont les hôtes les laissent indifférents. Alors que parmi ceux-ci la concorde la plus grande n'avait cessé de régner, le lapin blanc et noir attire l'attention, le 15 mars, par une agressivité insolite. Il se

jette sans raison sur ses congénères et les mord cruellement. L'un d'eux, le dos littéralement labouré par une plaie profonde de 12 cm de long sur 5 cm de large intéressant les muscles doit être sacrifié peu de temps avant le moment où vraisemblablement il allait succomber. Un deuxième présentant des lésions analogues doit également être sacrifié. Bientôt l'agitation est telle dans le clapier que l'agresseur doit être abattu. La phase paralytique de l'affection n'a pas eu ainsi le temps de se produire. Quoi qu'on pense à un épisode de sexologie plutôt qu'à la rage, l'encéphale du mordeur nous est envoyé en glycérine. Le 29 mars, une émulsion bulinaire est inoculée à un cobaye et à un lapin par voie intracérébrale. Le cobaye montre de la tristesse et de l'inappétence le 1^{er} mai (trente-deuxième jour), une paralysie généralisée le lendemain et est trouvé mort le 3 mai au matin (trente-quatrième jour). La corne d'Ammon renferme des corpuscules de Negri. Le lapin présente, le 9 mai (quarante et unième jour), les premiers symptômes d'une rage mi-furieuse, mi-paralytique et meurt deux jours plus tard. De nouveaux passages sont faits, qui déjà amènent la mort du lapin sept jours après l'inoculation et celle du cobaye six jours après elle. Un chien inoculé dans le cerveau présente, six jours plus tard, les premiers symptômes de la maladie et succombe le neuvième jour à une rage mi-furieuse, mi-paralytique. Un chat inoculé de même présente les premiers symptômes de la rage furieuse dès le cinquième jour et meurt le septième. Des rats blancs et des souris blanches inoculés dans les muscles de la nuque succombent du sixième au neuvième jour à des rages typiques. Le virus, qui ainsi a montré d'emblée une grande virulence, est entretenu par passage chez le cobaye. Les premiers symptômes apparaissent le quatrième jour et la mort survient le septième (virus renforcé).

Etant donné les circonstances et les locaux où la maladie s'était déclarée, il n'était pas possible d'incriminer le chien, le chacal, etc. Des rats par contre fréquentaient le clapier et trouvaient un refuge dans ses galeries souterraines. Bien qu'il n'ait pas été observé chez eux de mortalité et qu'aucune preuve péremptoire ne puisse être fournie, il paraît bien évident que ces rats seuls ont pu être les agents de la transmission. Il n'y a là rien d'inédit. En Espagne, au Chili, à Tanger même le rat a été accusé d'être un important réservoir de virus. A Istambul, à Bucarest, il a été pris sur le fait et la rage chez lui a été expérimentalement démontrée. L'épisode qui vient d'être relaté est à ajouter aux précédents.

**LA VACCINATION ANTI-DIPHTÉRIQUE
PEUT-ELLE ÉVEILLER
LA VIRULENCE D'UN BACILLE DE KOCH LATENT
DANS L'ORGANISME ?**

par P. REMLINGER et J. BAILLY.

(Institut Pasteur du Maroc, Tanger.)

L'hypothèse a été émise que la vaccination antidiptérique pouvait donner à un bacille de Koch latent dans l'organisme la possibilité de

se développer et de déterminer une généralisation de la tuberculose ou, tout au moins, la formation d'un abcès à l'endroit de la piqûre. L'expérience suivante paraît susceptible de contribuer pour une modeste part à la solution de la question.

Le 23 janvier, au cours de l'étude d'un pseudo-vaccin tuberculeux, 19 cobayes, d'un poids de 350 à 520 g, avaient reçu sous la peau une égale quantité d'une dilution de crachats bacillifères. La maladie était chez tous évolué de façon classique. Le 19 avril, 7 avaient déjà succombé à une généralisation du B. K. Quel allait être chez eux l'effet de la vaccination? 6 reçoivent sous la peau $1/2 \text{ cm}^3$ de l'anatoxine diphtérique de l'Institut Pasteur (1). L'injection est répétée à la dose de $1/2 \text{ cm}^3$ huit jours plus tard et à celle de 1 cm^3 huit jours plus tard encore. Les cobayes reçoivent ainsi intentionnellement une dose d'anatoxine très supérieure à celle de la vaccination infantile. Six autres cobayes reçoivent de même $1/2 \text{ cm}^3$ de vaccin associé antidiptérique, tétanique, typhoïdique et paratyphoïdique A et B (2). Une deuxième injection de $1/2 \text{ cm}^3$ est pratiquée après huit jours et une troisième de 1 cm^3 après quinze jours. Ici aussi, les doses sont proportionnellement très supérieures à celles qu'auraient reçues des enfants.

Six cobayes, nés de cobayes tuberculeux, ayant partagé pendant un temps plus ou moins long la cage de leurs parents et se trouvant ainsi dans des conditions voisines de celles des enfants chez qui la vaccination est pratiquée (3), sont traités comme les animaux précédents. Trois reçoivent en trois injections 2 cm^3 d'anatoxine diphtérique et 3 en trois injections également 2 cm^3 de vaccin associé.

Deux cobayes provenant de l'élevage reçoivent enfin, à titre de témoins, une dose identique (2 cm^3 en trois injections) d'anatoxine ou de vaccin associé. Ils n'ont présenté aucune réaction et sont demeurés vivants et bien portants.

Des 12 cobayes vaccinés, alors que la tuberculose était chez eux en évolution, 9 ont succombé à une généralisation de la maladie les 27 et 28 février, 5, 5, 8, 12, 14, 28 mai, 15 juin. Ils ne présentaient aucune lésion et, en particulier aucun abcès ni aux points d'injection des vaccins, ni dans les territoires ganglionnaires correspondants. Aucune différence ne pouvait être notée entre leur tuberculose et celle des 7 cobayes décédés avant d'être vaccinés les 10, 16, 16, 20 février, 26, 27 mars et 19 avril. Le 25 juin, cinq mois après l'inoculation tuberculeuse, un peu plus de deux mois après les injections d'anatoxine ou de vaccins associés, 3 cobayes sont encore vivants. La maladie évolue chez eux de façon classique (induration au point d'inoculation, tuméfaction ganglionnaire,

(1) « Vaccin anti-diphétique. Anatoxine. Trente unités anatoxine par centimètre cube. Préparé en mars 1950. Efficace jusqu'à mars 1952. »

(2) « Vaccin associé anti-diphétique, tétanique, typhoïdique et paratyphoïdique A et B enfants. Préparé le 15 février 1950. Efficace jusqu'au 15 février 1952. »

(3) On sait que le cobaye ne contracte que rarement la maladie dans les laboratoires, mais que toutefois la contagion est susceptible d'être réalisée par un contact intime dans la cage d'un animal malade (P. REMLINGER, ces *Annales*, 1923, 37, 686). dyspnée, amaigrissement). Il n'existe aucune lésion et en particulier aucun abcès aux points d'injection de l'anatoxine ou des vaccins non plus que dans les territoires ganglionnaires correspondants.

Les 6 cobayes vaccinés, après avoir partagé la cage de cobayes tuberculeux, sont demeurés bien portants (granulo-diagnostic négatif). Ils sont sacrifiés le 25 juin. L'autopsie la plus minutieuse ne montre aucune trace de tuberculose. Même absence de lésion aux points d'injection de vaccins ainsi que dans les zones ganglionnaires correspondantes.

Mêmes résultats chez les cobayes ayant reçu à titre de témoins des doses élevées d'anatoxine ou de vaccins.

De ces expériences, évidemment trop peu nombreuses, il résulte que, même injectés à forte dose, l'anatoxine diphétique et les vaccins formolés ne peuvent pas appeler à la virulence des B. K. qui seraient demeurés latents dans l'organisme et provoquer une généralisation de la tuberculose ou la formation d'un abcès. Ceux-ci n'apparaissent même pas si les vaccins sont injectés à forte dose à des cobayes chez lesquels la tuberculose est en évolution, ce qui, *a priori*, semblerait devoir réaliser les conditions les plus favorables à leur production.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA TUBERCULOSE EXPÉRIMENTALE DU COBAYE PAR INOCULATION INTRAGANGLIONNAIRE

par P. GASTINEL, Y. COUTEL et A. CIVATTE.

(*Laboratoire de bactériologie de la Faculté de Médecine.*)

Dans les *Annales de l'Institut Pasteur* d'octobre 1930, Ninni rapportait les résultats qu'il avait obtenus par l'inoculation de B. K. au cobaye par voie intraganglionnaire. Il montrait que ce tissu se prête admirablement au développement rapide du bacille *in loco*, en même temps qu'il élimine d'éventuels germes secondaires.

Ces travaux, rapportés dans plusieurs traités classiques sur la tuberculose, ne paraissent pas avoir été poursuivis : le perfectionnement des milieux de culture supplantait ce procédé.

Sans en vouloir faire aujourd'hui la critique, envisagée sous l'angle du diagnostic de la tuberculose, cette méthode nous a permis de préciser quelques particularités physiopathologiques de la tuberculose d'inoculation.

Nous avons inoculé à 28 cobayes, sous un volume de 2/10 de centimètre cube, des doses de B. K. allant de 1/5 000 à 1/10 de milligramme, souche H 37 V, cultivée en milieu liquide de Dubos.

Vingt-deux animaux ont été inoculés suivant la technique de Ninni dans un ganglion cervical, les 6 autres dans un ganglion inguino-crural. Si, en effet, les ganglions cervicaux sont généralement d'un volume supérieur et rendent l'inoculation plus facile, le développement rapide d'une importante adénopathie locale rend plus difficile le prélèvement ultérieur des ganglions inoculés. Au contraire, le nombre toujours réduit

des ganglions inguino-cruraux rend cette manœuvre plus aisée. En outre, bien que nous n'ayons jamais eu d'incident opératoire selon la technique de Ninni, il nous a paru plus facile de « pédiculer » les ganglions inguinaux pour les injecter.

Evolution générale. — Les animaux ainsi tuberculisés font une maladie dont l'allure générale est commune. On observe le même ameigrissement dont l'intensité et la précocité sont surtout fonction de la dose inoculée, et la seule particularité clinique tient à l'évolution ganglionnaire.

Très précocement en effet, se développe une adénopathie importante, dont le caractère régional est notable ; dans les dix premiers jours se constitue un paquet ganglionnaire multilobé plus ou moins enrobé de périadénite, duquel émerge d'une taille comparable à une noisette, le ganglion inoculé.

Si l'injection est faite à l'aine où le nombre des ganglions est beaucoup plus réduit, on trouve à la palpation un gros ganglion flanqué d'un ou deux satellites moins importants. Par contre, les adénopathies à distance sont cliniquement inconstantes, beaucoup plus tardives et toujours modestes. Le plus souvent, il faut attendre trente, quarante-cinq, soixante jours pour percevoir une augmentation nette du volume des ganglions de l'aine après inoculation cervicale.

Nous avons observé cinq fois une fistulisation des ganglions à la peau, toujours à un stade avancé de l'évolution. S'agit-il d'une fistulisation spontanée, comparable à l'ouverture cutanée d'un abcès froid costal chez l'homme, ou faut-il y voir la conséquence de la contamination cutanée par faute technique ?

La durée de l'évolution a été très variable. Ninni la croyait toujours raccourcie. Paraf discute cette opinion et, de fait, nous avons vu la mort survenir entre le trentième et le deux cent soixante-dixième jour suivant la dose inoculée et le poids de l'animal au départ.

A l'autopsie, on trouve les lésions viscérales habituelles à la tuberculose du cobaye : foie et surtout rate sont très hypertrophiés, congestifs et semés de foyers caséux parfois confluents en larges plages. Parfois, la périviscérite a développé une coque fibrocaséuse épaisse autour de la rate. Les poumons sont de même parsemés de nodules caséux plus ou moins confluents, sans que nous ayons remarqué une prédominance nette des lésions pulmonaires, comme le signale Ninni.

A quoi peuvent s'associer des épanchements séreux, parfois importants, sur lesquels nous reviendrons ?

Il est assez remarquable de retrouver, comme pendant la vie, la même inégalité lésionnelle dans la topographie des ganglions examinés à l'autopsie.

Toujours s'est développée une énorme adénopathie régionale : si l'inoculation a été cervicale on retrouve 8, 10, 12 ganglions dont certains atteignent la taille d'une noisette, envahissant toute la région, plus ou moins reliés par la périadénite et présentant macroscopiquement tous les aspects depuis l'hyperplasie simple jusqu'à la nécrose caséuse à peu près complète. En règle, on trouve à chaque creux axillaire et inguinal un ganglion caséifié, dont la taille est toujours très inférieure, souvent pisiforme. Les ganglions thoraciques superficiels, les ganglions lombaires sont inconstamment et modérément hypertrophiés. Les gan-

glions hépatiques, toujours très importants, en majorité totalement caséifiés, atteignent parfois la taille d'une amande.

De ce tableau assez commun, trois points nous paraissent devoir être isolés :

1^o *L'allergie est particulièrement précoce et intense.* — Dix jours après l'inoculation de 1/1 000 de milligramme de B. K. H 37 V l'intradermo-réaction au 1/100 est positive vingt et une fois sur vingt-huit, parfois escharrotique dès cette date. Dans les mêmes conditions, sur 8 cobayes témoins inoculés avec les mêmes doses par voie sous-cutanée, un seul est allergique dix jours plus tard, les autres le devenant dans les délais habituels de quinze à vingt jours.

Sur deux séries de 4 cobayes, l'intradermo-réaction au 1/1 000 est positive dans les mêmes délais. L'allergie croît d'ailleurs les jours suivants et 4 des cobayes ainsi éprouvés avaient au trentième jour une intradermo-réaction positive au 1/10 000. Ici, comme en bien d'autres circonstances, le ganglion paraît spécialement favoriser le développement de la sensibilisation allergique.

2^o *Le bacille tuberculeux se développe rapidement dans le ganglion.* — C'est la confirmation des travaux de Ninni, que nous avons vérifiée tant après inoculation d'une émulsion de B. K. à doses très faibles (1/5 000 de milligramme par dilution successive), qu'après injection du culot de centrifugation de liquides céphalo-rachidiens de méningite tuberculeuse.

Il est facile de voir les bacilles sur des frottis ganglionnaires comme à l'examen des coupes histologiques dans les dix premiers jours qui suivent l'inoculation.

Joint à la précocité de l'allergie, ce caractère doit être retenu pour avoir éventuellement une grande valeur diagnostique lorsqu'on doit expertiser un produit suspect « réductible à un volume de 2/10 de centimètre cube ».

Nous nous proposons d'étudier l'extension possible de cette méthode, qui associe aux avantages des cultures rapides celui de suivre en même temps la tuberculisation du cobaye. C'est dans cette intention que nous avons substitué à l'inoculation cervicale l'injection dans un ganglion inguinal plus facile à prélever dix jours plus tard sans risque d'incidents opératoires.

Après ablation du ganglion, la tuberculose du cobaye se poursuit jusqu'à la mort de l'animal, qui apportera les confirmations nécropsiques.

3^o Nous avons enfin fait l'examen histologique, après dix, vingt, trente, quarante-cinq jours d'évolution d'une part des ganglions inoculés, d'autre part des ganglions prélevés à distance pour compléter nos examens nécropsiques.

La comparaison de nos protocoles anatomiques montre une analogie à peu près absolue entre les ganglions inoculés et les ganglions à distance, examinés au même stade d'évolution clinique.

Au total, nous avons rencontré, diversement associés, quatre types lésionnels :

a) Homogénéisation avec diminution des centres clairs et prolifération lymphocytaire ;

b) Réaction réticulo-histiocytaire diffuse ;

- c) Formation de microabcès avec plages de polynucléaires ;
- d) Phénomènes vasculaires allant de la congestion à l'infarctus.

La prédominance chronologique de ces éléments analytiques, sur un fond de réaction inflammatoire subaiguë, revêt tantôt l'aspect d'une réaction réticulo-histiocytaire, précocement observée, tantôt l'aspect d'une congestion intense, qui paraît aller de pair avec le développement de l'allergie ; sur ces types lésionnels apparaissent précocement une fibrose jeune périglandulaire visible dès le douzième jour et surtout des plages d'abord très clairsemées, puis plus confluentes jusqu'à devenir globales, de nécrose caséuse.

Malgré l'analogie que nous avons signalée entre les ganglions inoculés et les ganglions réactionnels à distance, nous devons observer que les rares formations giganto-cellulaires n'ont été vues que sur les premiers, dans lesquels, d'autre part, la caséification est plus précoce.

Un autre caractère distinctif nous paraît digne d'être noté : alors que le B. K. est facilement retrouvé, et pour cause, dans le ganglion inoculé, nous ne l'avons observé qu'à titre exceptionnel à l'examen direct des ganglions réactionnels et inconstamment après culture.

De cette vue synthétique de nos examens histologiques nous voudrions enfin retenir un dernier caractère dont la quasi constance est assez frappante : la réaction vasculo-congestive.

Nous l'avons retrouvée à l'examen histologique du foie, de la rate et des poumons prélevés à l'autopsie, réalisant parfois de véritables nappes hémorragiques, surtout dans le foie ou la rate. Ailleurs, c'est un véritable infarctus qui s'est constitué, au milieu de la prolifération lymphoréticulaire commune.

Sans doute faut-il en rapprocher les épanchements séro-hématiques de la plèvre, et surtout du péritoine, que nous avons observés chez 6 animaux. Que ces lésions témoignent de l'intensité de l'allergie, nous en voulons pour preuve :

— leur développement parallèle au développement de l'allergie cutanée ;

— leur coexistence avec des ganglions mésentériques généralisés que nous n'avons observés que dans ces conditions ;

— leur apparition dans un de nos cas au lendemain d'une intradermo-réaction accidentellement trop forte qui a entraîné la mort de l'animal avec un infarctus mésentérique.

En résumé, l'inoculation au cobaye de B. K. par voie ganglionnaire nous a permis d'observer

— le développement du bacille *in loco*, avec les perspectives diagnostiques envisagées par Ninni ;

— les stades évolutifs de la réaction histologique du ganglion inoculé et des ganglions à distance ;

— l'intensité de l'allergie dont témoignent la positivité précoce de l'intradermo-réaction, les phénomènes vasculaires viscéraux, et qui s'inscrivent dans le processus réticulo-histiocytaire et dans les phénomènes vasculaires observés dans le ganglion biopsié.

**LE TRAITEMENT PAR LA NÉOMYCINE
DES SOURIS TUBERCULISÉES EST-IL EFFICACE ?**

par C. LEVADITI et M^{me} CHAIGNEAU-ERHARD.

(Institut Alfred-Fournier et Institut National d'Hygiène.)

La néomycine, antibiotique élaboré par le *Streptomyces fradiae* [1] et découvert par Waksman et Lechevalier [2], a été étudiée, du point de vue de son activité antituberculeuse *in vitro*, par Waksman, Hutchinson et Katz [3], qui ont montré que cet antibiotique agissait sur les souches de *Mycobacterium tuberculosis* normales ou streptomycino-résistantes. La création de telles souches insensibles à la néomycine paraît plus difficile que celle des mutants indifférents à la streptomycine [4]. Les effets antibacillaires *in vivo* ont été évalués chez le cobaye par Steenken, Wolinsky et Bolinger [5]. Administrée à la dose quotidienne de 5 000 U, la néomycine se révèle douée d'une activité curative incontestable, quoique inférieure à celle de la streptomycine, et cela chez les cobayes contaminés avec la souche H 37 Rv de bacilles tuberculeux. D'autres essais similaires ont été effectués par Karlson, Gainer et Feldman [6], avec des résultats nettement supérieurs à ceux-ci. En effet, le potentiel antibacillaire de la néomycine, évalué d'après la survie des cobayes traités, l'aspect macroscopique, leur étude histopathologique et leur teneur en B. K., apparut de tout premier ordre, bien que quelque peu inférieur à celui de la streptomycine. Quant aux expériences effectuées sur la souris tuberculisée, celles relatées par Rake [7] ont montré que la néomycine, injectée par voie sous-cutanée, est environ deux fois moins active que la streptomycine. Récemment, Carr, Pfuetze, Brown, Douglass et Karlson [8] ont utilisé le même antibiotique dans le traitement de la tuberculose humaine et ont enregistré des résultats symptomatiques favorables, les effets radiologiques étant toutefois inférieurs à ces derniers. Par ailleurs, Kadison, Volini, Hoffman et Felsenfeld [9] ont insisté sur l'insuffisance curative antituberculeuse de la néomycine chez l'homme et attiré l'attention sur les complications vestibulaires et rénales qu'elle occasionne. La toxicité assez élevée de cet antibiotique chez l'homme et les animaux est, d'ailleurs, actuellement reconnue.

M. Waksman ayant eu l'amabilité de nous faire parvenir de la néomycine (ce dont nous le remercions cordialement), nous avons entrepris quelques essais thérapeutiques chez les souris tuberculisées expérimentalement. Nos résultats font l'objet de la présente note.

Technique. — Inoculation (souche H. 512) suivant la technique utilisée dans nos travaux antérieurs. Deux lots. Le premier sert de témoin, infecté, mais non traité. Le second est constitué par des souris contaminées, puis traitées de la façon suivante (injection sous-cutanée) : pendant les quatre premiers jours, 1 000 U (par 20 g), puis, en raison d'une intolérance mani-

feste, seulement 500 U. par jour, pendant vingt-quatre jours. Cette dose fut, à nouveau, ramenée à 1 000 U, mais elle provoqua la mort de tous les sujets survivants, trente-cinq et trente-six jours après le début de l'expérience. Il en résulte que la néomycine a été administrée à des doses à la limite et, finalement, au-dessus de sa tolérance. Les résultats ont été évalués de la même façon que dans nos recherches antérieures.

RÉSULTATS. 1^o *Souris témoins.* — Mortalité entre dix-neuf et vingt-huit jours (maximum entre vingt et vingt-huit jours) : 100 p. 100. Lésions microscopiques pulmonaires : + — = 5 p. 100 ; de + + + + à ∞ = 95 p. 100. Taux bacillaire du poumon : de + + + + à ∞ = 95 p. 100. Donc, infection térebrante et constamment mortelle.

2^o *Souris traitées.* — Dose totale par souris : de 11 000 à 17 000 U. Mortalité entre vingt-trois et trente-six jours (maximum entre trente et trente-six jours) : 100 p. 100. Lésions microscopiques pulmonaires : + — — = 7,5 p. 100 ; de + + + à ∞ = 92,5 p. 100. Taux bacillaire du poumon : + = 15,4 p. 100 ; de + + à ∞ = 84,6 p. 100.

Ces données sont condensées dans le tableau ci-dessous :

TRAITEMENT	DOSE TOTALE en U	MORTALITÉ p. 100	LÉSIONS microscopiques p. 100			BK p. 100
			+ —	+ + + + à ∞ 95	+ —	
—	—	100	5	95	0	95
Néomycine (500 à 1 000 U par jour).	De 11 000 à 17 000.	100	+ — — 7,5	+ + + à ∞ 92,5	15,4	84,6

Ce tableau autorise les conclusions suivantes :

1^o Administrées quotidiennement, des doses de 1 000, puis 500 et enfin, à nouveau de 1 000 U par 20 g de néomycine se révèlent à la limite de la tolérance et même, à la longue, toxiques pour les souris tuberculées.

2^o La mortalité des sujets traités, comme d'ailleurs celle des animaux témoins, a atteint 100 p. 100. La durée de survie de 53 p. 100 des sujets a été de trente-cinq ou trente-six jours.

3^o L'examen microscopique des altérations pulmonaires et le taux bacillaire de ces altérations n'ont révélé aucun effet curatif de la néomycine. En effet, l'intensité des lésions pulmonaires a été de + + + à ∞ dans 92,5 p. 100 des cas, celle de la bacillose également de + + à ∞ dans 84,6 p. 100.

4^o La durée de la survie des animaux néomycinisés a été assez longue pour que l'antibiotique, administré à des doses particulièrement élevées, puisse manifester une activité thérapeutique éventuelle. Or, tel n'a pas été le cas, aucune différence appréciable n'étant apparue entre les souris témoins et les sujets traités.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES. — La néomycine, par elle-même toxique, n'a manifesté, dans les conditions de nos essais, aucune activité antituberculeuse *in vivo* chez la souris, et cela dans des circonstances où la streptomycine se serait certainement révélée efficiente.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Isolé par WAKSMAN et CURTIS. *Soil Sci.*, 1916, **4**, 99.
- [2] WAKSMAN et LECHEVALIER. *Science*, 1949, **109**, 305.
- [3] WAKSMAN, HUTCHINSON et KATZ. *Am. Rev. Tuberc.*, 1949, **60**, 78 (Cf. éditorial de *Lancet*, 13 août 1949, 290).
- [4] V. pour les détails : C. LEVADITI et coll. *Antibiotiques d'origine fongique, bactérienne ou végétale*, Baillière et fils, éditeurs, Paris, 1950, 101.
- [5] STEENKEN, WOLINSKY et BOLINGER. *Am. Rev. Tuberc.*, 1950, **62**, 300.
- [6] KARLSON, GAINER et FELDMAN. *Diseases of the Chest*, mai 1950, 495 (d'après une analyse de RAVINA, dans *La Presse méd.*, 1950, **58**, 899).
- [7] RAKE. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1949, **52**, 765.
- [8] CARR, PFUETZE, BROWN, DOUGLASS et KARLSON. *Am. Rev. Tuberc.*, 1951, **63**, 427.
- [9] KADISON, VOLINI, HOFFMAN et FELSENFELD. *J. Am. med. Assoc.*, 1951, **145**, 1307.

COMPARAISON DE L'ACTIVITÉ ANTITUBERCULEUSE DE LA NÉOMYCINE, DE LA VIOMYCINE ET DE LA STREPTOMYCINE

par FRANÇOISE GRUMBACH et NOËL RIST.

(*Institut Pasteur. Service de la Tuberculose.*)

L'activité antituberculeuse *in vitro* et *in vivo* de la Néomycine et de la Viomycine a été mise en évidence dès la découverte de ces nouveaux antibiotiques [1, 2, 3] ; leur activité, aussi bien sur les souches résistantes que sur les souches sensibles à la Streptomycine de bacilles tuberculeux, a particulièrement retenu l'attention.

Nous avons voulu nous rendre compte, en les comparant à la Streptomycine dans la tuberculose expérimentale de la souris, dans quelle mesure ils étaient applicables en thérapeutique.

Dans nos expériences *in vitro*, la Néomycine (1) est, à nombre égal d'unités, au moins aussi active que la Streptomycine sur les bacilles tuberculeux humains (en milieu de Youmans-sérum) ; mais, à poids égal (200 unités au milligramme), elle est cinq fois moins active ; la Viomycine (2), à poids égal et à nombre égal d'unités (l'unité étant

(1) Echantillons de Sulfate de Néomycine « Pfizer » titrant 200 unités au milligramme et de Sulfate de Néomycine « Rhône-Poulenc » titrant 215 unités au milligramme.

(2) Sulfate de Viomycine « Pfizer ».

équivalente à 1 γ de base pure), est quatre fois moins active que la Streptomycine.

Nous fondant sur ces rapports d'activité, nous avons réalisé différentes expériences sur la tuberculose de la souris, en tenant compte d'une part, de la toxicité de ces produits et d'autre part, de leur activité tuberculostatique.

Toxicité. — La DL₅₀ est, pour une souris de 20 g, de 25 mg pour la Streptomycine, et de 10 mg pour la Néomycine et la Viomycine. Mais, alors que la Néomycine, à la dose de 1 000 unités (5 mg) par jour et par souris, administrée en une fois sous la peau et pendant vingt-cinq jours, tue 50 p. 100 des souris, la Viomycine, administrée dans la mêmes conditions, est parfaitement tolérée à 6 000 unités (6 mg).

ACTIVITÉ THÉRAPEUTIQUE CHEZ LA SOURIS. — Nos expériences ont été faites sur des souris blanches ou grises (race dba), âgées de 32 à 36 jours, inoculées par voie veineuse avec 0,05 mg de la souche H₃₇Rv (culture en milieu homogène de Dubos âgée de 6 à 8 jours). Le traitement commence le lendemain de l'inoculation.

NÉOMYCINE. — *Expérience I* (souris blanches). — Expérience de « survie ». Trois lots de souris : un lot de 11 souris traitées avec 1 000 unités (5 mg) de Néomycine, par jour, par voie sous-cutanée en une fois ; un lot de 15 souris traitées avec 1 000 unités (1 mg) de Streptomycine, par jour, par voie sous-cutanée en une fois ; un lot de 17 souris non traitées : témoins.

Durée du traitement : vingt jours.

	MORTALITÉ DES SOURIS en jours	
	50 p. 100	100 p. 100
Témoins	20,5	25
Traitées néomycine	35	70
Traitées streptomycine	60	La dernière sacrifiée à 102 jours.

Les souris traitées à la Néomycine, qui meurent au bout de vingt-huit à trente jours, ne présentent pas de lésions appréciables visibles à l'œil nu, et sur frottis de poumon on ne trouve que 5 à 10 bacilles tuberculeux par champ microscopique. Il est très vraisemblable que ces souris meurent du fait de la toxicité de la Néomycine.

Du trentième au trente-cinquième jour, les souris, qui meurent, présentent, comme celles traitées à la Streptomycine, des lésions tuberculeuses évolutives contenant de nombreux bacilles : et, au soixantième jour, l'aspect des poumons à l'œil nu dans les deux lots est tout à fait comparable à celui des témoins au vingtième jour.

Expériences II et III (3) [souris blanches]. — Dans ces deux expériences, nous n'avons pas étudié le temps de survie. Le traitement

(3) Ces deux expériences, faites avec deux échantillons différents de Néomycine, ont donné des résultats tout à fait comparables : Expérience II avec Néomycine « Pfizer ». Expérience III avec Néomycine « Rhône-Poulenc ».

est poursuivi jusqu'à la mort de 50 p. 100 au moins des témoins (vingt-trois à vingt-cinq jours). À ce moment, toutes les souris sont sacrifiées et autopsiées.

Les résultats des expériences II et III sont consignés dans le tableau I (4).

L'examen histologique des organes confirme la valeur des résultats appréciés à l'œil nu. Il révèle chez les souris traitées soit à la Streptomycine, soit à la Néomycine des lésions tout à fait comparables en étendue et en nature, dans le poumon, le foie, la rate.

En résumé, ces trois expériences démontrent l'activité antituberculeuse certaine de la Néomycine. Elle est, en unités, aussi active que la Streptomycine, mais dans l'état actuel des préparations de Néomycine, cette dose active représente un poids de Néomycine cinq fois supérieur au poids de Streptomycine équivalent, et l'effet thérapeutique ne s'obtient qu'au prix d'un pourcentage important de mortalité par toxicité. Si, dans l'expérience de survie (exp. I) les souris traitées à la Néomycine meurent aux vingt-huitième, trentième jours sans lésions visibles à l'œil nu, la mortalité précoce est due à la toxicité. De même dans les expériences II et III, l'indice tuberculeux moyen, basé sur les lésions du poumon, est meilleur que celui des souris traitées à la Streptomycine, mais le nombre des bacilles sur frottis est plus élevé. Cette dissociation semble être un effet de la toxicité de la Néomycine qui agirait sur l'organisme de la souris en l'empêchant soit d'éduquer des lésions, soit de participer à la bactériostase.

VIOMYCINE. — Une première expérience a été réalisée sur des souris grises (race dba) auxquelles nous avons administré par voie sous-cutanée 3 mg par jour en une fois, parallèlement à 1 mg de Streptomycine.

Dans une deuxième expérience sur des souris blanches, nous avons administré 6 mg par jour de Viomycine parallèlement à 2 mg de Streptomycine.

Les résultats de ces expériences sont consignés dans le tableau II. Toutes les souris ont été sacrifiées au vingt-troisième jour.

Examen histologique : Les lésions tuberculeuses observées, tant dans le poumon que dans les autres organes (foie, rate, reins), sont sensiblement de même étendue et de même nature chez les souris traitées par la Viomycine (3 mg) ou par la Streptomycine (1 mg).

En résumé, à des doses trois fois supérieures (en poids) à celles de Streptomycine, la Viomycine est très active, aussi active que la Streptomycine. Les souris traitées à la Viomycine ne manifestent aucun signe d'intoxication et continuent à grossir. Le nombre des bacilles tuberculeux dans les organes est sensiblement le même dans les 2 cas.

(4) L'indice tuberculeux moyen est établi, d'après l'aspect macroscopique des lésions du poumon, de la façon suivante : 0, poumon normal ; 1, rares ou très rares granulations grises ; 2, assez nombreuses ou nombreuses granulations grises ; 3, très nombreuses granulations grises ou nombreuses blanches ; 4, très nombreuses granulations blanches. On donne une note de 0 à 4 à chaque souris et on fait ensuite la moyenne de ces notes dans chaque groupe.

TABLEAU I.

	MORTALITÉ AU 23 ^e JOUR		INDICE TUBERCULEUX MOYEN		NOMBRE DE BACILLES TUBERCULEUX par champ microscopique sur frotts d'organes	
	Expérience II	Expérience III	Expérience II	Expérience III	Expérience III	Rate
		Poumon		Raté		
Néomycine (1 000 u. = 5 mg). Streptomycine (1 000 u. = 1 mg). Témoins non traités	5/10 0/5 6/7	5/11 0/11 8/10	1,2 (5 souris) 1,6 (5 souris) 4 (7 souris)	1,46 (6 souris) 1,25 (10 souris) 4 (10 souris)	74 10 ∞	43 3 20
					39 18 ∞	8 4,5 48

TABLEAU II.

	MORTALITÉ AU 23 ^e JOUR		INDICE TUBERCULEUX MOYEN		NOMBRE DE BACILLES TUBERCULEUX par champ microscopique sur frotts d'organes	
	Expérience I (1)	Expérience II (2)	Expérience I	Expérience II	Expérience I	Rate
		Poumon		Raté		
Viomycine Streptomycine Témoins non traités	0/40 0/40 11/20	0/6 0/6 5/6	4,35 1,8 4	0,3 0,5 4	73 53 ∞	3,6 2,4 ∞
					1,40 1,10 ∞	1 0,8

(1) Expérience I : 3 mg de Viomycine et 1 mg de Streptomycine (souris dba).
(2) Expérience II : 6 mg de Viomycine et 2 mg de Streptomycine (souris blanches).

CONCLUSIONS. — Des résultats obtenus avec la Néomycine et la Viomycine dans la tuberculose expérimentale de la souris, on peut tirer les enseignements suivants :

Pour obtenir le même résultat thérapeutique, il faut administrer soit 1 mg de Streptomycine, soit 3 mg de Viomycine, soit 5 mg de Néomycine. D'autre part, si les toxicités aiguës de la Viomycine et de la Néomycine sont semblables, la toxicité chronique de la Viomycine est très inférieure à celle de la Néomycine, si bien que ces doses représentent pour la Viomycine une dose bien tolérée et pour la Néomycine une dose toxique.

De ces deux antibiotiques, tous deux moins actifs et plus toxiques que la Streptomycine, la Viomycine seule semble actuellement pouvoir prendre une place en thérapeutique antituberculeuse.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] S. A. WAKSMAN et H. A. LECHEVALIER. *Science*, 1949, **109**, 305.
- [2] R. A. PATELSKI. *Tr. Ninth Streptomycin Conf. of the Veterans Adm.*, avril 1950, 186.
- [3] A. C. FINLAY, G. L. HOBBY, F. HOCHSTEIN, T. M. LEES et coll., *Am. Rev. Tub.*, 1951, **63**, 1.

ASPECTS VARIÉS DE LA SENSIBILITÉ DU BACILLE TUBERCULEUX A LA PARA-ACÉTYLBENZALDÉHYDE-THIOSEMICARBAZONE (TbI) EN MILIEU DE YOUNMANS

par N. RIST, M^{me} S. CALS et W. JULLIEN.

(*Institut Pasteur. Service de la Tuberculose.*)

Après avoir été longtemps niée, la résistance du bacille de Koch au TbI a été récemment constatée par plusieurs auteurs. Nous avons relaté leurs travaux ailleurs et nous les avons confirmés en montrant que sur 8 souches bacillaires provenant de tuberculeux cavitaires traités par 3.5 à 23 g de TbI, 7 étaient huit à cent fois plus résistantes que les souches de malades non traités [1]. Le titrage de la sensibilité au TbI peut donc faire partie prochainement de la pratique courante. Il présente quelques particularités et les résultats en paraissent au premier abord beaucoup plus difficiles à interpréter que ceux des titrages de sensibilité à la streptomycine. C'est pourquoi nous croyons utile de systématiser ici les résultats de nos 78 premiers titrages en milieu de Youmans.

Technique. — Ensemencer les produits bacillifères sur milieu de Jensen et sur milieu de Dubos. Effectuer le titrage à partir de la culture en Dubos ou à partir d'un deuxième passage en Dubos de la culture sur Jensen, lorsque la densité de la culture atteint 0,4 à 0,8 mg de bacilles (poids frais) par centimètre cube. Ensemencer 0,01 mg de bacilles dans une série de tubes de 22 mm contenant 5 cm³ de milieu de Youmans au sérum, additionné de TbI à des concentrations croissant de 0,15 à 40 µg par centimètre cube. Lire les résultats après une, deux, trois et quatre semaines d'étauve. Pour obtenir la solution stock de TbI à 125 µg par centimètre cube, sans employer d'antipyrine ou de propylène-glycol comme les auteurs étrangers, faire bouillir 12,5 mg de TbI dans 100 cm³ d'eau distillée. Répartir en ampoules scellées, stériliser à l'autoclave et conserver à la glacière. Avant l'emploi, faire redissoudre les cristaux au bain-marie bouillant pendant une heure.

Le TbI en solution dans le milieu de Youmans non ensemencé s'altère rapidement à l'étauve. Si l'on fait des ensemencements après vieillissement à l'étauve, on observe le même pouvoir inhibiteur avec les concentrations suivantes de TbI :

Milieu fraîchement additionné de TbI	0,60 µg/cm ³
Milieu + TbI + 14 jours d'étauve	2,50 —
Milieu + TbI + 28 jours d'étauve	5 —

Le résultat du titrage dépend de l'importance de l'ensemencement : après un ensemencement de 0,01 mg de la souche H₃Rv, l'inhibition apparaît totale pendant huit jours avec 0,15 ou 0,30 µg de TbI par centimètre cube. Mais après un ensemencement de 0,1 mg, une culture apparaît dès le sixième jour dans les concentrations élevées de TbI. Ce fait semble indiquer que le TbI n'inhibe la multiplication qu'après un certain nombre de divisions préliminaires. Par ailleurs, il oblige à s'en tenir à l'ensemencement de 0,01 mg si l'on veut obtenir des titrages faciles à lire.

Les résultats des titrages sont bien différents selon qu'on observe la culture au huitième jour ou plus tard.

1^o LECTURE AU HUITIÈME JOUR. — Les souches se divisent nettement en deux catégories :

a) *Les souches sensibles*, pour lesquelles l'inhibition est totale entre 0,15 et 0,60 µg par centimètre cube. Sur 29 souches de malades n'ayant pas reçu de TbI, nous avons observé :

Souches inhibées par 0,15 µg/cm ³	8
Souches inhibées par 0,30 µg/cm ³	17
Souches inhibées par 0,60 µg/cm ³	4
Souche inhibée par 1,2 µg/cm ³	1

b) *Les souches résistantes* (obtenues chez des malades traités par le TbI ou isolées *in vitro* à partir de souches sensibles) donnent dès le huitième jour une culture nette jusque dans les tubes contenant 2,5 à 40 µg. Ces cultures sont composées de grains très nombreux, dont la taille, mais non le nombre, semble diminuer lorsque la concentration en TbI augmente, ce qui est exprimé sur notre tableau par des indices d'opacité de culture variant de 4+ à 1+.

Quelques souches résistantes se développent très lentement, même

dans le tube témoin. La lecture ne peut alors être faite qu'au quatorzième jour, lorsque leur tube témoin atteint une opacité comparable à celle qu'on observe habituellement au huitième jour.

Mais dans la règle, on peut faire le diagnostic des souches résistantes dès le huitième jour. Plus tard, les phénomènes se compliquent et il est beaucoup plus difficile de distinguer une souche sensible d'une souche résistante.

2^e LECTURE APRÈS LE HUITIÈME JOUR. — Nous n'insisterons pas sur les *souches résistantes*. Les cultures continuent à se développer et apparaissent dans quelques tubes restés limpides jusqu'alors.

Plus intéressantes à observer sont les *souches sensibles*, qui se développent de façons très variées et qu'on peut schématiquement grouper en deux types (voir tableau).

Dans le type I (9 souches), l'immense majorité des bacilles est définitivement inhibée dans sa multiplication, à partir de 0,60 ou 1,2 µg, et le milieu reste limpide. Mais quelques très rares bacilles se multiplient, d'où l'apparition, vers le vingt et unième ou exceptionnellement le vingt-huitième jour, et dans tous les tubes, de grains bien individualisés, qui augmentent rapidement de volume, *mais qui restent en petit nombre* (5 à 50).

Ce phénomène tardif a été observé par Canetti et Saenz [2] à l'occasion des titrages de sensibilité à la streptomycine en milieu de Youmans et ces auteurs ont montré que ces grains représentent des colonies de bacilles résistants.

Il en est de même en TbI : repiqués en milieu de Dubos à partir des tubes étiquetés 20 ou 40 µg de TbI, puis retitrés, ces bacilles se sont montrés résistants à 40 µg à la première lecture.

Dans le type II (8 souches, dont la souche H₃₇Rv), une culture composée d'un *nombre infini* de grains très fins apparaît vers le quatorzième jour dans tous les tubes, et, chose curieuse, avec une abondance presque égale dans tous les tubes. Puis ces cultures se rapprochent de l'aspect en nombreux gros grains ou en flocons des témoins. On peut faire entrer dans le cadre du type II des souches pour lesquelles les cultures tardives n'apparaissent qu'au vingt et unième jour, ou ne dépassent pas les tubes étiquetés 5, 10 ou 20 µg.

Six fois nous avons prélevé ces cultures, apparues entre le dixième et le vingtième jour, pour les titrer. Quatre fois, bien que provenant de tubes étiquetés 20 ou 40 µg, elles se sont montrées aussi sensibles que les souches qui leur avaient donné naissance. La raison de leur apparition ne peut donc être cherchée dans leur résistance. Geks [3], ayant observé le même phénomène avec une souche et la disparition de tout effet inhibiteur dans le filtrat de la culture, en a conclu que le bacille avait détruit le TbI. Nous avons vu plus haut que le TbI s'altère spontanément à l'étuve, ce qui rend l'hypothèse de Geks inutile. Sans doute cette altération favorise-t-elle l'apparition des cultures tardives, mais elle est trop faible pour l'expliquer entièrement et nous devons admettre de plus que, contrairement aux souches du type I, celles du type II sont seulement *ralenties* dans leur multiplication par le TbI. L'importance de ce retard semble être presque indépendant de la concentration de TbI (tableau, type II).

TbI µg/ml	SOUCHES résistantes			SOUCHES SENSIBLES					
				Type I			Type II		
	jours			jours			jours		
	7	14	21	7	14	21	7	14	21
0,15	4 +	5 +	7 +	1 +	2 +	3 +	1 +	5 +	8 +
0,30	4 +	5 +	6 +	0	1 +	2 +	0	4 +	6 +
0,60	3 +	4 +	5 +	0	0	0 20 grains.	0	3 +	5 +
1,2	3 +	4 +	5 +	0	0	0 20 grains.	0	2 +	5 +
2,5	3 +	4 +	5 +	0	0	0 20 grains.	0	2 +	5 +
5	2 +	3 +	5 +	0	0	0 20 grains.	0	2 +	5 +
10	2 +	3 +	4 +	0	0	0 10 grains.	0	2 +	4 +
20	1 +	2 +	4 +	0	0	0 10 grains.	0	2 +	4 +
40	1 +	2 +	3 +	0	0	0 5 grains.	0	2 +	4 +
Témoin	4 +	6 +	8 +	4 +	6 +	8 +	4 +	6 +	8 +

Deux fois, par contre, ces cultures tardives se sont montrées contenir des bacilles résistants. Nous admettons que l'abondance du développement tardif a masqué l'existence de grains résistants semblables à ceux du type I.

Cette interprétation est d'autant plus légitime qu'à côté des types I et II existe un type dont le caractère mixte apparaît à l'œil nu (7 souches). *Dans ce type mixte* apparaît, du dixième au vingtième jour, une culture diffuse composée de très nombreux grains très fins, sur lesquels tranchent quelques gros grains compacts. Selon les proportions relatives de ces grains, des types très variés de cultures sont concevables et sont effectivement observés, dans les tubes contenant du TbI.

CONCLUSIONS. — Il peut coexister dans les souches n'ayant jamais été en contact avec le TbI trois variétés de bacilles : des bacilles dont la multiplication est définitivement arrêtée en présence de TbI, des bacilles dont le TbI ralentit la multiplication, et des bacilles résistants d'emblée au TbI.

Cette variété explique les aspects très divers que peuvent prendre les cultures de ces souches, à l'occasion d'un titrage de sensibilité au TbI. Elle explique aussi qu'à lésions égales, les malades peuvent répondre très différemment au traitement par le TbI.

L'existence de bacilles résistants d'emblée, au sein de petits échantillons (0,01 mg) de populations bacillaires normales, est très fréquente et se manifeste dès la première culture en présence de TbI, sans qu'il soit nécessaire de faire plusieurs passages. Elle fait comprendre la fréquence de la résistance chez les cavitaires traités par le TbI.

Le milieu de Youmans paraît particulièrement favorable à cette analyse des souches : dans ce milieu, les descendants des individus résistants restent groupés en amas qui deviennent visibles à l'œil nu, alors qu'en milieu de Dubos ils se dispersent. D'autre part, pour imprégner un milieu solide avec du TbI, substance très peu soluble, il faut

recourir à des artifices, comme l'ont montré récemment Coletsos et M^{les} Laroche et Oriot [4].

BIBLIOGRAPHIE

- [1] W. JULLIEN, N. RIST et S. CALS. *Rev. de la Tub.*, *Soc. Franç. de la Tub.*, 9 juin 1951.
- [2] G. CANETTI et A. SAENZ. *Ces Annales*, 1949, **77**, 610.
- [3] F. S. GEKS. *Zeitschr. Hyg.*, 1950, **130**, 622 et **131**, 345.
- [4] J. COLETSOS, M^{le} LAROCHE et M^{le} ORIOT. *Ces Annales, Soc. Franç. de Microbiologie*, 7 juin 1951.

AUGMENTATION DU VOLUME DU BACILLE DE KOCH EN PRÉSENCE D'ACIDE *p*-AMINOSALICYLIQUE (PAS)

par O. KITAMOTO, N. RIST et J. GIUNTINI.

(*Institut Pasteur. Service de la Tuberculose.*)

La mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux au PAS dans les milieux liquides de Dubos et de Youmans est rendue difficile par le fait, constaté par Youmans [8], que plus l'ensemencement est lourd, plus la concentration minima inhibitrice de PAS est forte. Si, par exemple, on augmente l'ensemencement de 0,0001 mg à 0,01 mg par centimètre cube de milieu, il faut augmenter la concentration en PAS de 0,12 µg à 2,5 µg par centimètre cube, pour empêcher l'apparition d'une culture visible à l'œil nu.

Ce phénomène traduit le fait que le PAS n'arrête la multiplication du bacille qu'après un certain nombre de divisions inévitables (Sievers [5 bis], J. Lehmann [4], Rist [5,6]), qui se manifestent au microscope par la présence de torsades ou « cordes » caractéristiques. On comprend que si l'ensemencement est lourd, ces quelques divisions inévitables permettront à la culture de devenir visible à l'œil nu.

Dans la zone des faibles ensemencements visés ci-dessus, comme le nombre de ces divisions est d'autant plus faible que la concentration en PAS est plus forte [5, 6], il suffit d'augmenter suffisamment la concentration en PAS pour empêcher l'apparition d'une culture visible à l'œil nu. Mais si l'on augmente le poids de l'ensemencement au-dessus de 0,01 mg par centimètre cube, on constate qu'aucune concentration de PAS n'est plus inhibitrice : un trouble apparaît jusqu'à dans les tubes contenant 1 000 µg de PAS par centimètre cube [2, 7], ce qui, d'une part rend le titrage de la sensibilité impossible, et, d'autre part, laisse supposer que même une concentration considérable de PAS est incapable d'amener à zéro le nombre des divisions inévitables.

Pour étudier ce dernier phénomène, nous avons ensemencé 0,05 à 0,5 mg de bacilles sensibles au PAS (souches H₃₇Rv) et provenant d'une culture en milieu de Dubos, dans 5 cm³ de ce milieu, additionné de 5 à 1 000 µg de PAS par centimètre cube. Nous avons observé ce qui suit :

a) L'opacité de la culture augmente pendant quatre à six jours,



FIG. 1. — Cultures de neuf jours en milieu de Youmans. En haut : milieu normal. Au milieu: PAS, 20 µg par millilitre. En bas : streptomycine, 20 µg par millilitre. (Photomicrographie P. Manigault).

puis se fixe à un taux stable pendant six à huit jours, avant de diminuer à nouveau, lorsque interviennent les phénomènes de lyse.

b) Entre 5 et 1 000 μg de PAS par centimètre cube, l'augmentation de l'opacité est indépendante du taux de PAS.

c) L'opacité finale est proportionnelle au poids de l'ensemencement,

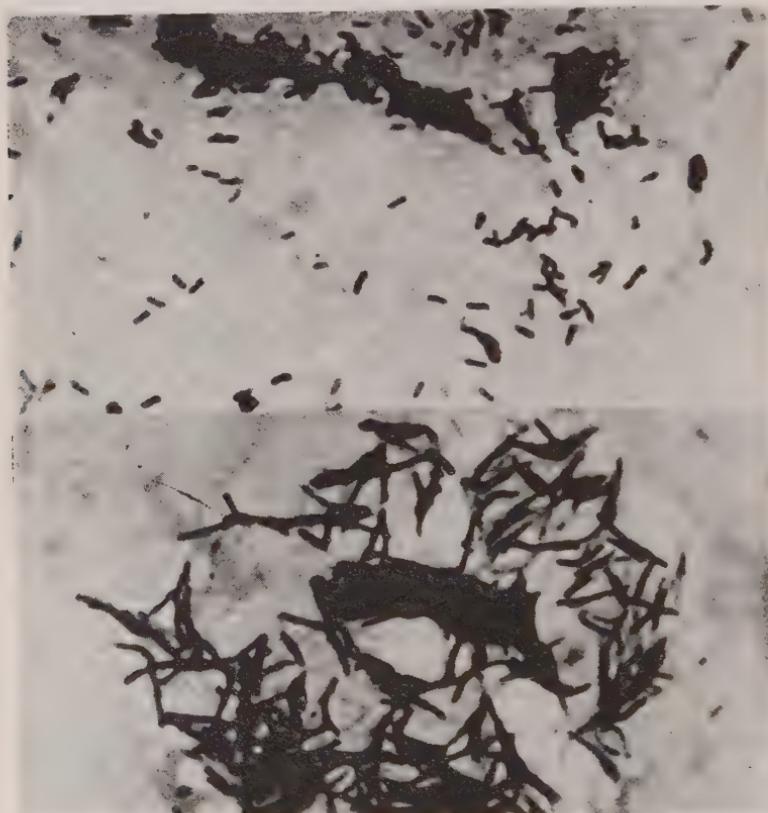


FIG. 2. — Cultures de dix jours sur milieu de Löwenstein-Jensen. En haut : milieu normal. En bas : milieu imprégné après coagulation par PAS, 0,5 μg par centimètre carré (méthode de Coletsos et Boisvert). [Photomicrographie P. Manigault.]

c'est-à-dire que l'opacité finale est toujours quatre à six fois plus forte que l'opacité originelle, alors qu'en milieu streptomyciné au même taux, l'opacité de la culture n'augmente pas.

On observe les mêmes phénomènes en milieu de Youmans au sérum, mais la culture s'y présentant en grains de plus en plus gros, les mesures précises d'opacité sont impossibles. Par contre, les phénomènes tardifs de lyse sont beaucoup moins importants qu'en milieu de Dubos.

De ces faits, il était naturel de conclure que, aux concentrations de PAS envisagées, le bacille pouvait se diviser deux ou trois fois avant que sa multiplication soit arrêtée.

Nous pensions pouvoir trouver la preuve microscopique de ces divisions sur les cultures sur lame, sous la forme d'ébauches de cordes. Or nous n'avons retrouvé sur les cultures sur lame (en milieu de Youmans additionné de PAS) que des bacilles isolés, ou de petits amas

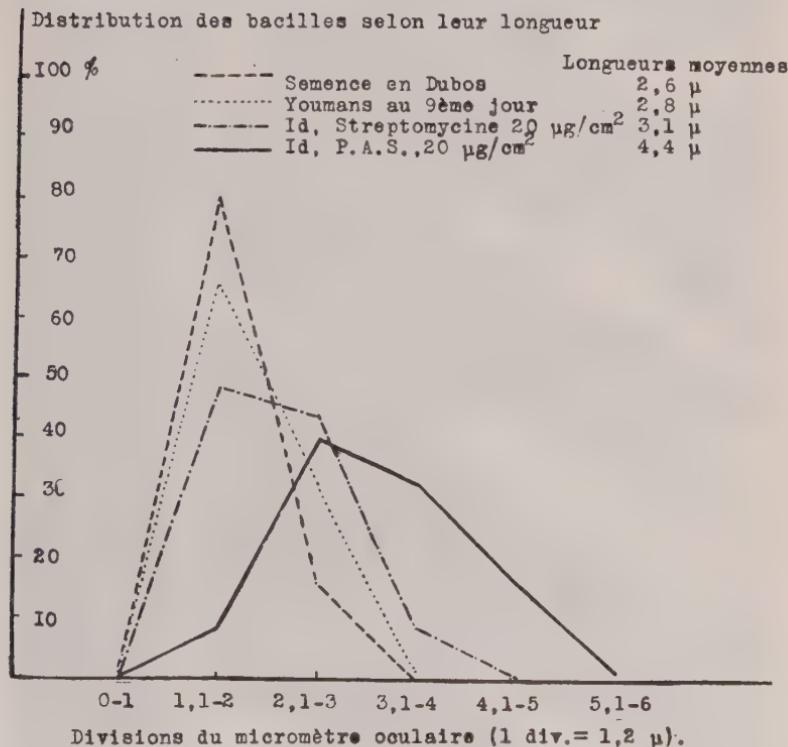


FIG. 3. — Distribution des bacilles selon leur longueur.

identiques à ceux qu'on trouve dans les suspensions bacillaires en milieu de Dubos qui servent à l'ensemencement.

Par contre, nous avons été frappés par le volume considérable des bacilles soumis à l'influence du PAS, et il nous a semblé que cette augmentation de volume pouvait expliquer au moins en partie l'augmentation d'opacité des cultures (1).

(1) S'il est classique de dire que l'opacité d'une culture microbienne dépend non seulement du nombre de bactéries mais aussi de leur taille, le fait n'a guère été signalé par les auteurs qui étudient les courbes d'opacité en milieu de Dubos. Seuls Bretey et M^{me} Imelik [4] l'ont mis en valeur à propos du bacille aviaire.

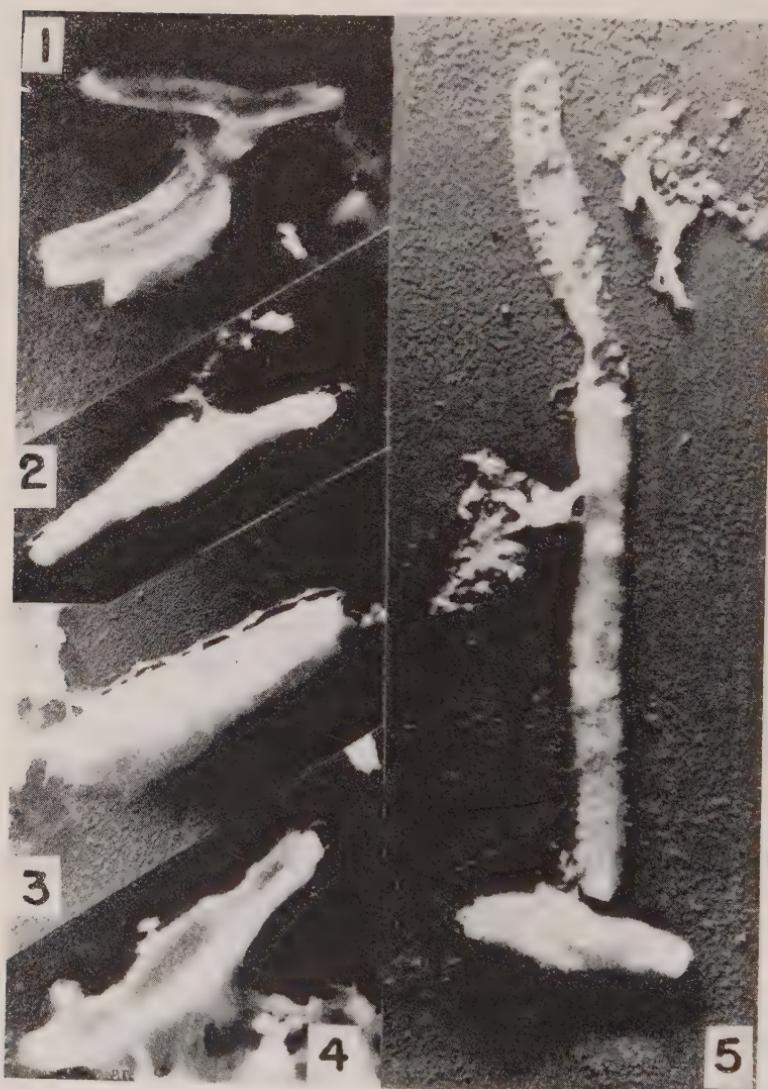


FIG. 4. — Images de microscopie électronique. (Gross. : $\times 15\,000$.) Cultures de neuf jours en milieu de Youmans. 1, quatre bacilles en milieu normal; 2, 3, 4 et 5, PAS, 20 μ g par millilitre. En 2, un bacille; en 3 et 4, deux bacilles accolés; en 5, une forme monstrueuse.

Cette augmentation de volume s'observe aussi bien sur les cultures sur lame que sur les frottis de cultures en milieux liquides ou sur milieu solide de Jensen (2). Les photographies (fig. 1 et 2) montrent que cet agrandissement frappe à première vue.

D'après les mensurations des bacilles, leur longueur moyenne augmente de 70 p. 100 en six à neuf jours dans un milieu de Youmans additionné de PAS (20 µg par centimètre cube), alors qu'elle augmente de 20 p. 100 seulement en milieu streptomyciné au même taux (fig. 3). A faible concentration, la streptomycine augmenterait aussi le volume bacillaire (Espersen [3]).

La largeur augmente également, mais ne peut être mesurée au



FIG. 5. — Quelques formes fréquemment observées en milieu de Youmans contenant 20 µg de PAS par millilitre. En *a*, forme habituelle en milieu sans PAS.

microscope ordinaire. Le microscope électronique (fig. 4) nous a montré que la largeur des bacilles augmente en PAS de 80 à 100 p. 100. Leur épaisseur est variable : certains bacilles sont très épais, d'autres paraissent plats, si l'on en juge par leurs ombres.

Les grains foncés colorés par le Ziehl apparaissent sur les photographies électroniques sous forme de nodules compacts, qui semblent soulever la surface du bacille.

La morphologie des grands bacilles qui apparaissent en PAS est assez variable. On trouve fréquemment des formes en fusneau, en massue, et de longues formes granuleuses (fig. 5). Mais on ne peut

(2) Dans ce dernier cas, l'augmentation de volume des bacilles ne se traduit pas, comme en milieu liquide, par un phénomène macroscopique.

qu'exceptionnellement parler de formes monstrueuses, car on retrouve la plupart de ces aspects dans les cultures normales, mais en nombre beaucoup plus petit. Il est possible que ces formes correspondent à des phases normales de la division bacillaire, éphémères dans les cultures normales, mais fixées par le PAS.

CONCLUSIONS. — En présence de PAS, le volume du bacille de Koch s'agrandit de trois à six fois. Ce fait peut expliquer pourquoi l'opacité d'une culture augmente de trois à six fois, même en présence de taux considérables de PAS, qui semblent capables d'empêcher toute multiplication du bacille. Il explique aussi certaines difficultés rencontrées au cours de la mesure de la sensibilité au PAS.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. BRETEY et M^{me} S. IMELIK. *Ces Annales*, 1949, **77**, 223 et 597.
- [2] J. BRUN, J. VIAILLIER et J. C. KALB. *Le Poumon*, 1949, **5**, 375 ; *C. R. Soc. Biol.*, 1950, **144**, 1364.
- [3] E. ESPERSEN. *Acta path. mier. Scand.*, 1949, **26**, 178.
- [4] J. LEHMANN. *Congrès Union Int. Tub.*, Copenhague, 1950.
- [5] N. RIST, P. VÉRAN, B. BALLET, M^{me} F. GRUMBACH et R. TRICHEREAU. *Sem. Hôp. Paris*, 1951, **27**, 1823.
- [5bis] O. SIEVERS. *Lancet*, 1949, **1**, 798.
- [6] P. VÉRAN, N. RIST, B. BALLET, M^{me} F. GRUMBACH et R. TRICHEREAU. *Rev. Tub.*, 1951, **15**, 86.
- [7] G. WIDSTROM et B. SWEDBERG. *Le Poumon*, 1949, **5**, 225.
- [8] G. P. YOUNMANS, G. W. RALEIGH et A. S. YOUNMANS. *J. Bact.*, 1947, **54**, 409.

RECHERCHES SUR LE BOTULISME ÉQUIN EXPÉRIMENTAL

par J. JACQUET et A.-R. PREVOT.

(*Institut Pasteur
et Laboratoire de Biologie et d'Hygiène de Caen.*)

L'existence en France du botulisme équin spontané a été prouvée par l'identification immunologique de trois souches de *Cl. botulinum*, n°s 468, 571, 573, isolées dans trois foyers différents [1], à l'agent du mal d'Aiseau, considéré par Willems [2] comme étant le type D.

En 1950, 25 foyers ont été étudiés [3] et cette étude a révélé de nombreuses inconnues ne pouvant être résolues que par la réalisation expérimentale de cette toxi-infection (1). Entre temps, l'échange de nos souches et de nos immunsérumns avec les souches et sérumns de

(1) Des expériences récentes ont montré, en effet, que, tout au moins chez le cobaye, il s'agit d'une toxi-infection et non pas d'une intoxication pure comme on le pensait jusqu'ici.

Sterne et Wenzel [4] nous a montré que ce que nous considérons, en Belgique, en Allemagne et en France comme étant le type D était le type C des Sud-Africains et des Espagnols, et inversement. Une Commission de 7 membres, émanant du Comité international de Nomenclature, étudie actuellement ce problème et publiera ultérieurement ses décisions. Quoi qu'il en soit, nous avons eu en vue, dans ce travail, la reproduction, chez le cheval, non pas du botulisme A ou B comme l'ont fait, en 1946, R. Legroux, J. Levaditi et L. Lamy [5], mais bien du botulisme équin (du type C sud-africain, syn. D européen).

L'expérience unique que nous avons pu faire a été possible grâce à la subvention de recherches qui a été attribuée au Laboratoire départemental et régional de Biologie et d'Hygiène à Caen, par le Comité de la Recherche vétérinaire, à qui nous adressons nos plus vifs remerciements.

Nous nous sommes servis de la toxine 468 précipitée par le sulfate d'ammonium et desséchée dans le vide. 1 mg de cette toxine correspond à 2 000 doses minima mortelles (DMm) pour la souris de 20 g par voie sous-cutanée. Pour nous mettre dans les conditions les plus voisines de la maladie naturelle, nous avons choisi la voie orale qui, pour les autres botulismes (A et B), exige environ cent fois plus de toxine que la voie sous-cutanée.

Le 19 avril, à 11 heures du matin, un cheval de 13 ans, pesant environ 250 kg, ingère 1 dg de cette toxine (soit 200 000 DMm sous-cutanées souris) incorporé dans une poignée de son frisé. Le même jour, à 23 heures, l'animal est couché en décubitus sterno-abdominal et ne peut plus se relever, ayant le train postérieur paralysé. La dyspnée est déjà installée. A minuit, il présente 28 respirations à la minute, entrecoupées de grandes contractions abdominales. Les muscles droits et externes de l'abdomen essayent de suppléer à la paralysie du diaphragme et leur contraction dessine une barre à chaque respiration sur la paroi abdominale. La mydriase est nette et n'est pas influencée par la lumière. La salivation n'est pas très abondante, mais le cheval présente des mouvements réguliers de la langue (72 par minute). A noter, encore, un silence partiel de l'intestin à l'auscultation.

Le 20 avril, à 1 heure du matin, le cheval présente le « signe du nez ». La respiration est de plus en plus difficile. L'exitus est constaté à 5 h. 30, soit moins de dix-huit heures après le repas infectant. Nous avons donc réalisé le tableau du botulisme suraigu, tel que plusieurs éleveurs l'ont observé spontanément dans leurs écuries.

A priori, le cheval est donc par voie orale beaucoup plus sensible que la souris par voie sous-cutanée.

L'autopsie a été faite le vendredi matin. On constate :

Une coloration jaune des graisses, cartilages et trachée ;

Une congestion des muqueuses de la trachée, du larynx et du pharynx ;

Une congestion localisée en grandes plaques de l'intestin grêle, du côlon replié et du cæcum ;

Un léger degré de péritonite ;

Une congestion des méninges et des plexus choroïdes ; le liquide céphalo-rachidien est hémorragique.

Des prélèvements de foie et d'os long ensemencés sur place ont déjà montré l'envahissement par la flore intestinale (colibacille et entérocoque).

Recherche de la toxine sur le vivant. — Le 19 avril, à 18 heures, avant l'apparition de tout symptôme, nous avons prélevé du sang à la jugulaire et inoculé 2 souris avec 1/4 et 1/2 cm³ respectivement. Toutes deux présentaient, dès le lendemain, les paralysies flasques du botulisme et le « signe du nez », et moururent en deux jours et demi. Ainsi, le passage précoce de la toxine dans le sang se fait avant même l'apparition des symptômes.

Recherche de la toxine sur le cadavre. — Des prélèvements de foie, muscle, rate, poumon, bulbe, nerfs lombaires, ganglions, rein, ovaire, estomac, intestin, cœur, urine, sang et liquide céphalo-rachidien ont été faits au cours de l'autopsie ; les organes ont été triturés en eau physiologique et celle-ci injectée par fractions à des souris. En voici les résultats :

Le foie contient au moins 4 DMm souris par centimètre cube.

Le muscle contient au moins 8 DMm souris par centimètre cube.

La rate contient au moins 4 DMm souris par centimètre cube.

Le poumon contient au moins 8 DMm souris par centimètre cube.

Le bulbe contient une DMm très lente par centimètre cube.

Le nerf lombaire contient une DMm lente par centimètre cube.

Le rein, l'ovaire, le contenu gastrique, l'intestin grêle contiennent une DMm lente ou très lente.

Les parois de l'estomac, du côlon replié, du cæcum contiennent également une DMm lente.

Le sang étant toxique, nous avons séparé le sérum des globules ; les globules lavés ne sont pas toxiques ; par contre, le sérum contient 4 DMm par centimètre cube.

Le liquide céphalo-rachidien contient une DMm par centimètre cube. L'urine elle-même filtrée sur bougie L3 contient une toxine tuant la souris au 1/2 cm³.

En revanche, les ganglions lymphatiques (mésentériques, œsophagiens, trachéo-bronchiques), de même que le tissu adipeux, ne contiennent pas de toxine.

CONCLUSIONS. — 1^o L'ingestion d'une toxine botulique équine, isolée en France par l'un de nous [1], est capable de provoquer le botulisme équin suraigu expérimental, mortel en dix-huit heures à la dose de 1 dg ; le cheval est donc beaucoup plus sensible que la souris.

2^o Le passage de la toxine dans le sang est constaté sept heures après le repas toxique ; ce fait peut servir au diagnostic *ante mortem* de la maladie naturelle.

3^o Après la mort, la toxine est présente dans le sérum, le liquide céphalo-rachidien, les centres nerveux, les muscles, les viscères et l'urine. Il sera peut-être possible d'utiliser cette particularité pour assurer le diagnostic *post mortem* au cours de l'affection naturelle.

BIBLIOGRAPHIE

[1] A.-R. PRÉVOT et E. R. BRYGOO. Ces *Annales*, 1950, 79, 1.

[2] R. WILLEMS. *Acta Biol. Belg.*, 1941, 4, 353-356.

[3] A.-R. PRÉVOT, M. HUET et P. TARDIEUX. *Bull. Acad. Vétér. France*, 1950, 23, 481.
 [4] M. STERNE et L. M. WENZEL. *Congrès intern. vétér. Londres*, 1949.
 [5] R. LEGROUX, J. LEVADITI et R. LAMY. *Ces Annales*, 1946, 72, 1545.

RECHERCHES SUR *CATENABACTERIUM CATENAFORME* ET SUR SON POUVOIR PATHOGÈNE

par M. MOUREAU.

(Institut Pasteur. Service des Anaérobies.)

En 1935, Eggerth [1] avait décrit sous le nom de *Bacteroides catenaformis* un bâtonnet Gram-négatif, anaérobiose, non sporulé qu'il avait isolé six fois de l'intestin humain normal. Il l'avait décrit sommairement, mais suffisamment pour que cette espèce puisse être retrouvée et identifiée. Il n'a fait aucune mention de son pouvoir pathogène. En 1938, Prévot ayant démontré l'invalidité du genre *Bacteroides* l'a classé parmi les espèces non gazogènes du genre *Catenabacterium* [2].

Depuis quatre ans cette espèce a été isolée trois fois dans le Service des Anaérobies :

I. — *Souche 297*, isolée en culture pure du pus d'un empyème humain mortel (provenant du Service du professeur Damade, de Bordeaux).

II. — *Souche 656 B*, isolée du pus d'un phlegmon survenu à la suite d'une périctonite post-appendiculaire (provenant du Service du Dr Bernard, Hôpital Saint-Joseph, que nous remercions très vivement de cet envoi). Elle était associée dans ce pus à *Fusiformis biacutus*.

III. — *Souche 646*, isolée en culture pure d'un pus de pleurésie purulente mortelle (envoi du Dr P. Cordier que nous remercions très vivement).

Ainsi dans 2 cas sur 3, il s'agissait de pleurésies purulentes monomicrobiennes, mortelles malgré un traitement intensif par les antibiotiques.

Le troisième malade n'a pu être sauvé de sa périctonite compliquée de phlegmon que par une thérapeutique énergique conjuguant plusieurs antibiotiques à très hautes doses : pénicilline, streptomycine et auréomycine, la chloromycétine se révélant enfin la plus efficace. Au cours du traitement, il présente 5 récidives.

Il s'agit, par conséquent, et ceci est le fait nouveau mis en lumière par l'étude de ces 3 souches, d'une espèce extrêmement pathogène pour l'homme.

Commençons par rappeler les caractéristiques morphologiques, physiologiques, culturales et biochimiques. Toutes 3 correspondent exactement à la description morphologique d'Eggerth : bâtonnet en chaînettes de 20 à 100 éléments ou plus, où la segmentation n'est pas toujours apparente, avec fréquence très grande des éléments

incurvés tortueux donnant aux filaments l'aspect bouclé, surtout aux extrémités. Contrairement aux souches d'Eggerth nos 3 souches poussaient en bouillon VF glucosé sans donner de bactériogée. Parfois quelques renflements discrets. En gélose profonde elles donnent des colonies lenticulaires, ne liquéfient pas la gélatine, ne modifient ni le lait ni les protéines. Une des souches était peu réductrice, les deux autres réduisaient le rouge neutre et la phénosafarine. Toutes 3 fermentaient de nombreux glucides : glucose, levulose, maltose, galactose, saccharose amidon et lactose ; aucune ne réduisait les nitrates en nitrites. L'une était un ferment formo-butyrique lactique, l'autre acéto-butyrique lactique, la troisième acéto-propionique lactique. Les autres produits de fermentation sont l'ammoniaque, des traces d'amines volatiles et d'aldéhydes.

Ces 3 souches semblent donc répondre à une variété très pathogène, à colonies lenticulaires, et à culture non visqueuse en bouillon.

Mais c'est surtout le pouvoir pathogène de cette variété qui pose un problème grave rentrant d'ailleurs dans le cadre général du pouvoir pathogène de la flore endogène souvent exposé par A.-R. Prévet et encore récemment dans un travail d'ensemble [3].

Nous exposons ici le cas particulier du *Catenabacterium catenaforme* qui illustre bien ce problème général. Deux souches ont indiscutablement provoqué la mort à l'état pur ; le troisième cas n'a pu être guéri que par une thérapeutique d'une violence remarquable.

Les tests de sensibilité aux différents antibiotiques ont donné les résultats suivants par la méthode de A.-R. Prévet [4] au vert-janus.

DOSE INHIBITRICE	
Auréomycine	8 µg
Pénicilline	0,125 U.O.
Chloromycétine	10 µg
Streptomycine	160 µg
Terramycine	1 µg

On remarquera que la pénicilline est très active *in vitro*. Ceci souligne les différences souvent importantes entre les sensibilités aux antibiotiques *in vitro* et *in vivo*, la précision des résultats du laboratoire ne reflétant pas exactement les conditions de la clinique.

Fait aussi paradoxal, la culture pure récemment isolée, ne provoque aucune lésion chez la souris, le cobaye, le lapin, même à haute dose par voie intraveineuse. Elle ne secrète ni toxine, ni substance toxique, ni hémolysine, et les corps microbiens eux-mêmes n'ont aucun constituant toxique. On se demande dès lors comment cette espèce est si pathogène pour l'homme et nous répétons à son sujet les hypothèses que Prévet a formulées si souvent pour de nombreux cas semblables :

- 1^o Ou bien l'homme serait la seule espèce sensible ;
- 2^o Ou bien la substance responsable du pouvoir pathogène ne se développerait jamais en culture sur milieu artificiel.

Quoi qu'il en soit, les faits que nous observons avec *Catenabacterium catenaforme* coïncident exactement avec ce que nous savons du mode de propagation des anaérobies endogènes :

a) L'habitat normal de cette espèce est l'intestin humain où Eggerth l'a trouvée six fois ;

b) L'infection focale primitive dans le premier cas a été une appendicite aiguë où la bactérie s'est propagée par contiguïté au péritoine d'abord pour donner une péritonite aiguë, puis à la paroi pour donner un phlegmon ;

c) Dans les deux autres cas l'infection focale est restée inapparente et c'est la métastase pleurétique mortelle qui constituait l'unique tableau clinique.

Le fait que plusieurs centaines d'espèces anaérobies agissent de la même façon mystérieuse et notre connaissance imparfaite des substances responsables, limitée d'ailleurs aux deux cas de *Sphaerophorus funduliformis* et *necrophorus* et de *Ristella melanogenica*, incitent à entreprendre de nouvelles recherches afin d'essayer de résoudre ces problèmes.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] EGGERTH, cité par WEINBERG, NATIVELLE et PRÉVOT. *Les microbes anaérobies*, 1937, 632.
- [2] PRÉVOT. *Manuel de Classification des anaérobies*. 2^e édition. Masson, Paris, 1948, 107.
- [3] PRÉVOT. *Revue Belge Pathol. et Med. exp.*, 1951 (à paraître).
- [4] PRÉVOT. *Ces Annales*, 1946, 72, 471.

RECHERCHES SUR *ACUFORMIS FILAMENTOSUS*

par N. ALADAME.

(*Institut Pasteur. Service des Anaérobies.*)

En 1911, Distaso [1] a isolé de l'intestin humain normal un anaérobie à spores terminales qu'il avait nommé *B. putrificus filamentosus*. Cette espèce a été classée par Prévot en 1940 dans le genre *Acuformis* sous le nom d'*A. filamentosus*. Il semble qu'il s'agisse d'une espèce rare puisqu'elle n'avait pas encore été retrouvée depuis 1911. Une souche reçue de Yougoslavie, provenant de l'intestin d'un mouton atteint d'entérotoxémie mortelle (1) a été identifiée par nous comme appartenant à cette espèce. Nous avons pu ainsi compléter la description sommaire de Distaso.

Il s'agit d'un bâtonnet droit de $2,8 \mu \times 0,4 \mu$, immobile, Gram-positif pourvu de très rares spores terminales ovales de petite taille ; très souvent il présente des formes en quille. Il résiste une minute à 100°. Sa longévité est supérieure à deux mois. Il réduit la phénosafranine, le rouge-neutre et la safranine. Ses cultures sont gazogènes et putrides. Les colonies en gélose profonde sont arborescentes. Les milieux liquides sont troublés d'une façon homogène ; la gélatine est liquéfiée ; le lait

(1) Nous remercions vivement le professeur Katic de cet envoi.

est coagulé, puis partiellement digéré avec précipitation de la caséine résiduelle. Les protéines coagulées ne sont pas attaquées. Il fait fermenter le glucose et le maltose. Il ne réduit pas les nitrates en nitrites.

La fermentation du bouillon VF glucosé à 1 p. 100 produit SH_2 , NH_3 (1,7 g par litre), amines volatiles, aldéhydes, alcools, cétones, une acidité volatile de 2,62 g par litre, constituée par le mélange isobutylique/acétique = 2/1 et de l'acide lactique.

Il n'a aucun pouvoir pathogène pour le cobaye et ne produit ni toxine, ni hémolysine.

Il s'agit donc d'un protéolytique non pathogène de l'intestin de l'homme et des herbivores.

BIBLIOGRAPHIE

[1] DISTASO, cité par WEINBERG, NATIVELLE et PRÉVOT. *Les microbes anaérobies*, 1937, 504.
 [2] PRÉVOT. *Manuel de Classification des anaérobies*. 2^e édit., 1948, Masson, 219.

ACTION DES PRESSIONS TRÈS ÉLEVÉES SUR LE VIRUS DE NEWCASTLE

I. — DISSOCIATION DU POUVOIR INFECTIEUX ET DE L'HÉMAGGLUTINATION

par P. ATANASIU, E. BARBU, et J. BASSET (1).

(Institut Pasteur, Service des Virus [Dr LÉPINE]
et Service de Chimie biologique [Dr MACHEBOËUF].)

On sait [1, 2] d'une manière générale que les virus perdent leur virulence lorsqu'on les soumet à une pression hydrostatique de l'ordre de 4 000 kg/cm². Dans le cas de la peste aviaire [3] cette perte de la virulence peut s'accompagner, pour certaines pressions (4 000 atmosphères), d'une conservation du pouvoir antigène et vaccinant, qui ne disparaît qu'à des pressions plus élevées.

On sait d'autre part [4] que le pouvoir hémagglutinant et la virulence du virus de Newcastle n'ont pas été dissociés par chauffage dans les conditions où une dissociation fut obtenue pour le virus grippal.

Une dissociation a pu être obtenue par de faibles doses de formol pour le virus de Newcastle et celui de grippe souche Lee [4].

Nous avons tenté de dissocier le pouvoir hémagglutinant et la virulence du virus de Newcastle en le soumettant à diverses pressions.

Technique et matériel. — Nous avons employé la souche « Var » 1949 dont les caractères ont été étudiés antérieurement [5, 6]. Pour obtenir le matériel virulent, nous avons récolté les liquides chorio-allantoïdiens

(1) Avec la collaboration technique de Marius Roche.

et amniotiques de 10 à 20 œufs, préalablement inoculés, selon les techniques habituelles [7].

Ce matériel, employé tel quel, après une légère centrifugation, est réparti en plusieurs tubes en caoutchouc non vulcanisé (gomme Latex). Les tubes sont remplis et fermés par une ligature soigneusement faite, en évitant la présence de toute bulle d'air. Un tube est conservé à 37° comme témoin. Les autres sont soumis à différentes pressions à la température de 37° pendant trente minutes (1). La pression est obtenue selon les techniques décrites par James Basset [8].

Résultats expérimentaux. — Dans une première expérience, le taux d'hémagglutination du témoin est de 1/2 560 (technique de Salk [9]) et le pouvoir infectant est de $LD_{50} = 10^{-7,5}$. Le pouvoir infectant est déterminé en inoculant 0,1 cm³ dans la cavité chorio-allantoïdienne d'œufs de onze jours d'incubation. Le matériel à inoculer est dilué dans le sérum physiologique en progression logarithmique de 10⁻¹ à 10⁻⁹. Le tableau I résume les résultats.

TABLEAU I. — Action des hautes pressions (2 000 à 6 000 kg/cm²), sur l'hémagglutination et le pouvoir infectant du virus de New castle.

VIRUS NEWCASTLE	TAUX d'hémagglutination	POUVOIR INFECTANT								
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
Témoin	1/2 560									
2 000 atmosphères	1/2 560	4/4	4/4	4/4	4/4	2/4	2/4	0/4	40 - 7,5	
3 000 atmosphères	1/2 560	4/4	4/4	4/4	4/4	2/4	1/4	0/4	40 - 7,23	
4 000 atmosphères	1/640	0/4	0/4	0/4	4/4 (1)	0/4			40 - 6,5	
5 000 atmosphères	1/320	0/4	0/4							0
6 000 atmosphères	1									0

(1) Morts en soixante-douze heures.

On voit que le pouvoir infectant reste inchangé à 2 000 kg/cm², qu'il commence à diminuer à 3 000 kg/cm² [$LD_{50} = 10^{-6,5}$] (2) et qu'il est complètement aboli à 4 000, 5 000 et 6 000 kg/cm².

Au contraire, l'hémagglutination reste inchangée à 3 000 kg/cm² ; elle commence à baisser à partir de 4 000 kg/cm² ; elle ne disparaît complètement qu'à 6 000 kg/cm².

La deuxième série d'expériences (tableau II) précise la dissociation entre l'hémagglutination et la virulence entre 2 950 et 4 000 kg/cm².

(1) Nous remercions vivement M. James Basset qui nous a prêté les presses utilisées.

(2) Pour le virus soumis à 3 000 kg/cm², on observe pour la dilution 10⁻⁶ un retard de la mort de l'embryon (soixante-douze heures au lieu de trente-huit à quarante-huit heures).

TABLEAU II. — Hémagglutination et pouvoir infectant du virus de Newcastle après action des hautes pressions (2 950 à 4 000 kg/cm²).

VIRUS NEWCASTLE	TAUX d'hémagglutination	POUVOIR INFECTANT									
		N. D. (1)	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
Témoin	1/1 280										
2 950 atmosphères	1/1 280	3/3	3/3	3/3							
3 200 atmosphères	1/1 280										
3 500 atmosphères	1/1 280		3/3 (2)	3/3 (2)	0/3	0/3	0/3				
3 800 atmosphères	1/1 280	0/3	0/3	0/3	0/3						
4 000 atmosphères	1/1 280	0/3	0/3	0/3							

(1) N.D., non dilué.

{2} Morts en soixante douze heures.

Le taux d'hémagglutination reste inchangé pour toutes ces pressions, tandis que pour la pression de 3 500 kg/cm² la virulence passe de LD₅₀ = 10^{-8,5} pour le témoin, à 10^{-3,5} pour l'échantillon soumis aux ultrapressions.

A 3 800 et 4 000 kg/cm² le matériel comprimé n'est plus virulent par la voie chorio-allantoïdienne.

Pour confirmer ces résultats, nous avons soumis le virus de Newcastle à une concentration et à une purification partielle par centrifugation (quatre-vingt-dix minutes à 14 000 g, puis trois lavages par l'eau physiologique en centrifugeant 18 000 g pendant une heure). Le culot est mis en suspension dans l'eau physiologique (le volume final étant le 1/10 du volume initial).

La suspension du virus ainsi obtenue fut soumise à 4 500 kg/cm² pendant trente minutes à 37°. Elle a conservé son pouvoir hémagglutinant, tandis que toute virulence par voie chorio-allantoïdienne avait disparu (tableau III).

TABLEAU III. — Action de la pression sur la virulence et l'hémagglutination du virus de Newcastle concentré et partiellement purifié.

VIRUS	TAUX	POUVOIR INFECTANT							
		10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻¹	10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³	LD. 50 p. 1° 0
NEWCASTLE concentré	d'hémaggluti- nation								
Témoin. 4 500 kg/cm ²	120 480 120 480	0/4	0/4	0/4	4/4	2/4	0/4	10 - 10	

En résumé. — Le pouvoir hémagglutinant et la virulence du virus de Newcastle, qui ne se dissoient pas par le chauffage, peuvent être facilement séparés par une pression hydrostatique convenable.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] James BASSET, E. WOLLMAN, M. MACHEBOEUF et M. BARDACH. *C. R. Acad. Sci.*, 1933, **196**, 1138.
- [2] James BASSET, S. NICOLAU et M. MACHEBOEUF. *C. R. Acad. Sci.*, 1935, **200**, 1882.
- [3] P. LÉPINE, James BASSET et M. MACHEBOEUF. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **121**, 202.
- [4] C. M. CHU. *J. Hyg.*, 1948, **46**, 247.
- [5] P. LÉPINE, H. JACOTOT, P. ATANASIU et A. VALLÉE. *Ces Annales*, 1949, **77**, 84.
- [6] P. ATANASIU et G. GAREAU. *Ces Annales*, 1951, **80**, 674.
- [7] C. LEVADITI et P. LÉPINE. *Traité des Ultravirüs des Maladies humaines*, Maloine, 1948.
- [8] James BASSET. *Chimie et Industrie*, 1945, **53**, 303.
- [9] J. E. SALK. *J. Immunol.*, 1944, **49**, 87.

UTILISATION D'UN TEST BIOCHIMIQUE COMPLÉMENTAIRE POUR L'IDENTIFICATION DU VIBRION CHOLÉRIQUE

par C. PARIS et J. GALLUT.

(Institut Pasteur.)

Le diagnostic bactériologique du choléra est fondé sur l'ensemble des caractères morphologiques, culturaux, biochimiques, sérologiques et chimiques de l'agent de cette maladie : le *Vibrio cholerae*. Bien que la valeur de ces différents caractères soit d'importance inégale, les caractères sérologiques étant primordiaux et les autres n'apportant au diagnostic qu'un élément de présomption, celui-ci n'est pas inutile et la recherche des caractères biochimiques notamment conserve toujours un intérêt qui ne peut que s'accroître avec la diversité des tests proposés.

Jusqu'à présent, on pouvait compter au nombre de ces derniers : la réaction du choléra-roth (Poels, 1886), la recherche de l'hémolyse et de l'hémodigestion (Van Loghem, 1912), l'action sur le saccharose, le mannose et l'arabinose (Heiberg, 1935) et la recherche de l'acétylméthyl-carbinol (Voges-Proskauer, 1898), toutes épreuves régulièrement utilisées pour caractériser le *V. cholerae* et le différencier des autres vibrios.

A notre connaissance, il n'a été fait état de l'action du vibron cholérique sur le citrate de sodium, que d'une manière tout à fait épisodique dans le travail de Simmons [1], où cet auteur a préconisé

l'emploi du milieu citraté solide, aujourd'hui bien connu, destiné à remplacer avantageusement le milieu liquide de Koser [2], et où la seule souche de *V. comma* essayée a donné un résultat négatif.

Contrairement à l'exemple unique cité par Simmons, il nous est apparu que l'action du vibron cholérique sur le citrate de sodium pouvait être mise en évidence d'une façon tout à fait nette et très régulière par l'emploi des deux milieux de Koser et de Simmons qui constituent un des tests employés dans le diagnostic des *Escherichia* et des *Salmonella*.

VIBRIONS UTILISÉS. — Nous avons soumis aux deux tests de Koser et de Simmons 155 vibrions de notre collection se répartissant en :

1^o 108 *V. cholerae* comprenant :

13 souches utilisées pour la fabrication des vaccins dans divers instituts (U. S. A., Grande-Bretagne, Suisse, Inde).

33 souches isolées en Egypte (1947).

60 souches provenant d'Asie, dont 53 d'Indochine (1931-1938), 1 du Siam (1936), 2 de l'Inde (1933), 2 de Chine (1932) et 1 de l'Irak (1931).

2 souches européennes très anciennes, isolées l'une à Marseille (1916), l'autre en Italie (1913).

2^o 15 *V. el-Tor* comprenant 9 vibrions non pathogènes (Hedjaz, 1906-1931) et 6 pathogènes (Célestes, 1937-1938).

3^o 32 vibrions non cholériques, d'origines diverses et de même répartition géographique que les vibrions cholériques, comprenant 15 souches isolées chez l'homme, 10 souches isolées des eaux et 7 diverses.

TECHNIQUES. — 1^o *Composition des milieux* : Milieu de Koser :

Phosphate biammonique	1,5 g
Phosphate monopotassique	1,0 g
Sulfate de magnésium (7 H ₂ O)	0,2 g
Citrate de sodium	3,0 g
Eau distillée	1 000 cm ³

Ce milieu est réparti en tubes de 17 et stérilisé à 115° vingt minutes.

Milieu de Simmons :

Chlorure de sodium	5 g
Sulfate de magnésium (7 H ₂ O)	0,2 g
Phosphate monoammonique	1 g
Phosphate bipotassique	1 g
Citrate de sodium	2 g
Gélose	20 g
Eau distillée	1 000 cm ³

Chauffer pour faire fondre la gélose et ajouter 10 cm³ de bleu de bromothymol en solution alcoolique à 1,5 p. 100. Répartir en tubes de 17 et stériliser vingt minutes à 115°. (La solution de bleu de bromothymol est obtenue en broyant au mortier 1,5 g de bleu de bromothymol R. A. L. dans 16 cm³ de soude décinormale et en complétant à 100 cm³ avec de l'alcool à 70°.)

2^o *Ensemencement*. — Ces milieux ont été ensemencés largement en partant d'une culture de vingt-quatre heures sur gélose nutritive ordinaire.

L'alcalinisation du milieu mise en évidence par le virage au bleu du milieu de Simmons et du milieu de Koser, après addition d'une goutte de

solution alcoolique de bleu de bromothymol, nous a permis d'identifier facilement les souches utilisant le citrate de sodium.

RÉSULTATS. — 1^o *Sur milieu de Simmons.* — Parmi les vibrions cholériques, nous avons pu noter 94 résultats nettement positifs après vingt-quatre heures, 4 accusant un virage partiel qui devient net en deux à trois jours, 4 négatifs à la vingt-quatrième heure mais virant au positif en moins de dix jours et 6 restant négatifs après dix jours. En tenant compte des virages partiels, nous pouvons donc compter dès la vingt-quatrième heure 98 résultats positifs, soit 90 p. 100, et 102 en un délai maximum de dix jours, soit 94,44 p. 100.

Le petit nombre de vibrions d'el Tor ne nous permet pas de tirer des conclusions aussi valables pour ce groupe dans lequel nous avons compté après dix jours 12 résultats positifs, soit 80 p. 100.

Nous ferons la même observation pour le groupe des vibrions non agglutinables par un sérum anticholérique « O », dont les résultats après dix jours se répartissent en 17 positifs et 15 négatifs.

2^o *Sur milieu de Koser.* — Lorsque le milieu est ensemencé suivant la technique classique, c'est-à-dire avec une très petite quantité de culture, l'apparition du trouble du milieu marquant la poussée du germe est difficile à apprécier et les résultats obtenus sont souvent inconstants.

Par contre, les résultats sont comparables à ceux obtenus sur milieu de Simmons lorsque le milieu est ensemencé largement et que la lecture est faite en ajoutant 1 goutte de bleu de bromothymol ; mais l'appréciation du virage partiel est moins facile. En effet, l'observation des tubes du milieu de Simmons ensemencés avec des souches utilisant lentement le citrate de sodium montre que le virage au bleu du milieu n'apparaît souvent très nettement que dans une partie localisée pour gagner ensuite progressivement tout le tube. L'observation du même phénomène en milieu de Koser après avoir ajouté l'indicateur donnera un virage moins franc après dilution dans la totalité du tube.

Il est, d'autre part, difficile de connaître le moment opportun de la lecture pour ajouter l'indicateur coloré si celui-ci n'a pas été incorporé au milieu avant stérilisation.

C'est pourquoi le milieu de Simmons doit être préféré pour la recherche de ce test.

VALEUR DU TEST DE SIMMONS DANS LE DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE DU CHOLÉRA. — Nous avons indiqué dans un tableau les résultats comparés des tests biochimiques usuels du vibron cholérique (cholera-roth, Heiberg et Voges-Proskauer) et du test au citrate de sodium en milieu de Simmons, pratiqués sur les mêmes souches.

Les chiffres montrent que le test que nous proposons n'est aucunement inférieur dans ses résultats aux tests classiques. Les quatre tests utilisés donnent en effet, dans tous les cas, avec le vibron cholérique un pourcentage de résultats significatifs supérieur à 93,7 p. 100.

Le fait qu'un certain nombre de vibrions banaux, formant du reste un groupe très hétérogène, fournissent les mêmes réponses que la presque totalité des vibrions cholériques, diminue évidemment la valeur absolue de ces tests biochimiques. Nous pouvons constater en effet, à

Résultats des différents tests biochimiques.

TESTS	RÉSULTAT	<i>V. cholerae</i> (103 souches)		V. BANNAUX (32 souches)	
		1	p. 100	1	p. 100
Cholera-roth	Réaction positive.	103	95,3	23	71,8
Heiberg.	Saccharose + Mannose + Arabinose -	101	93,7	13	40,6
Voges- Proskauer.	Réaction négative.	106	98,4	9	28,1
Simmons.	Réaction positive.	102	94,4	17	53,1

(1) Nombre de souches répondant au résultat mentionné pour chaque test.

ce point de vue, que la réaction du cholera-roth, pourtant universellement recherchée, est pratiquement sans valeur spécifique, puisque plus des trois quarts des vibrions non cholériques produisent aussi de l'indol et des nitrites.

La réaction de Voges-Proskauer paraît plus spécifique : à peu près toujours négative chez le vibron cholérique, elle ne l'est que dans moins d'un tiers des cas chez les vibrions communs ; mais il faut noter que cette réaction est utilisée davantage pour confirmer le diagnostic des vibrions hémolytiques d'el Tor, où elle est positive, que pour le diagnostic des vibrions cholériques eux-mêmes.

Si l'on accorde généralement une valeur réelle au test de Heiberg, même en tenant compte du fait que près de la moitié des vibrions banaux se comportent vis-à-vis du saccharose, du mannose et de l'arabinose comme la presque totalité des vibrions cholériques, il nous paraît justifié de réservier la même faveur au test du citrate de sodium qui fournit dans les deux groupes de vibrions des pourcentages de même ordre de grandeur que le test de Heiberg.

En conclusion, nous estimons donc que le test du citrate de sodium en milieu de Simmons, plus spécifique que le cholera-roth et aussi sûr que le test de Heiberg, peut apporter un élément de présomption supplémentaire utile au diagnostic bactériologique du choléra. Ce milieu présente en outre une facilité d'emploi et une rapidité de réponse qui nous incitent à préconiser son utilisation dans la pratique courante.

BIBLIOGRAPHIE

[1] J. S. SIMMONS. *J. inf. Dis.*, 1926, 39, 208.
 [2] KOSER. *J. Bact.*, 1924, 9, 59.

**QUELQUES OBSERVATIONS
SUR LA MICROFLORE AUTOTROPHE
DE LA LAGUNE D'ABIDJAN (CÔTE-D'IVOIRE)
OXYDANT LE SOUFRE ET SES COMPOSÉS**

par HÉLÈNE WINOGRADSKY.

(Institut Pasteur, Service de M. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE)

et J. APPERT.

(Institut Français du Pétrole
et Institut Pasteur, Service des Fermentations.)

Notre publication a pour but de présenter un aspect purement descriptif de la flore oxydant le soufre et ses composés dans des échantillons prélevés par J. Debyser, ingénieur à l'Institut Français du Pétrole, dans la lagune d'Abidjan avant la rupture du barrage qui l'isolait partiellement de la mer. Nous avons voulu déterminer la présence qualitative d'organismes spécifiques et nous n'avons pas recherché l'isolement en culture pure. Les échantillons de sédiments et d'eau étaient recueillis dans des flacons de 60 cm³ stériles, entièrement remplis, à fermeture étanche ; ils ont été conservés en glacière après leur prélèvement et analysés dès leur arrivée en France. Leurs caractéristiques sont présentées dans le tableau ci-dessous :

NUMÉRO	PROFONDEUR	NATURE	DISTANCE DE LA RIVE
53 (1 et 2)	70 à 80 cm sous le sable	Eau-Mangrove. Racine de palétuvier-Sable.	Bord de l'eau.
74 (1 et 2)	3 m.	Vase et eau presque douce.	30 m. de la rive.
86 (1 et 2)		Vase épaisse.	
93	8 m.	Vase et eau saumâtre.	Milieu de la lagune.

En 1946, Prévot [1] avait remis, à l'un d'entre nous, deux échantillons prélevés par lui dans la même lagune ; leur étude n'a pu être effectuée complètement et il n'a été possible que de déceler la seule présence de Rhodobactéries dans les cultures brutes.

Nos échantillons contenaient de l'hydrogène sulfuré, décelable à l'odeur et au papier à l'acétate de plomb, moins nettement dans les échantillons 86. Nous y avons recherché les bactéries oxydant les

composés partiellement oxygénés du soufre, le soufre élémentaire et l'hydrogène sulfuré.

OXYDANTS DES COMPOSÉS DU SOUFRE PARTIELLEMENT OXYDÉS. — Nous avons employé la technique de Waksman [2] déjà utilisée par nous dans des études antérieures. Elle consiste à ensemencer 100 cm³ du milieu approprié, à 5 g par litre de thiosulfate de sodium [3], que nous appellerons milieu « 65 », en fioles d'Erlenmeyer de 150 à 200 cm³, avec 1 cm³ de chaque échantillon. On mesure le pH et on effectue un essai au réactif iodo-amidoné à intervalles réguliers de cinq à sept jours, ou moins si l'état de la culture le permet ; dans le cas où cette dernière réaction est négative, on rajoute environ 0,5 cm³ de solution de thiosulfate de sodium. Le pH est ajusté approximativement, au papier, au voisinage de 6,7-7,0, valeur convenant parfaitement à un premier ensemencement. Comme nous l'avons observé antérieurement, si l'échantillon étudié est riche en germes spécifiques, ceux-ci ajustent, eux-mêmes, le pH à la valeur optima. Pour les échantillons pauvres, il est bon de maintenir le pH à la valeur initiale indiquée, car il a tendance à s'élever à des valeurs qui ne conviennent pas à ces organismes ; c'est ce qui se produisait pour les témoins non ensemencés.

Le premier ensemencement a été effectué le 22 juin 1950. Les échantillons étaient tous ensemencés en milieu « 65 » en deux séries parallèles, l'une en eau douce, l'autre avec addition de 15 g par litre de chlorure de sodium.

Le processus débute avec une intensité exceptionnelle, jamais observée par nous antérieurement [4]. Nous désignerons les ensemencements par le numéro de l'échantillon. Au bout de quarante-huit heures, 74 (1 et 2) présentent un trouble très prononcé, avec formation de soufre élémentaire surnageant à la surface du liquide et retombant au fond du récipient au bout de quatre jours pour le premier. La culture 53 (1) est à peine opalescente et sur 53 (2) s'est formée une pellicule très mince. Les fioles 86 sont troubles avec, en milieu saumâtre, une pellicule blanche de surface. 95 est faiblement opalescent.

Au bout d'une semaine le réactif iodo-amidoné donne une indication négative, le pH étant descendu à 3,0-4,0 sauf pour 53 (1) pour lequel la réaction du thiosulfate est encore positive et le pH de 8,8 en eau douce et 6,1-6,5 en eau saumâtre, de même que pour 53 (2) en eau douce avec un pH de 6,0.

Ces premières séries de cultures montrent que les germes spécifiques oxydant le thiosulfate avec dépôt de soufre élémentaire des échantillons étudiés sont tous nettement halophiles, mais tolérants à l'eau douce, à l'exception probable de 53 (2).

Beijerinck [5] indique que Nathanson a observé l'oxydation du thiosulfate par des souches marines, et Bunker [6] signale que Issatchenko et collaborateurs ont isolé, de l'eau de mer, 3 souches possédant les mêmes propriétés.

L'examen microscopique de ces cultures, particulièrement celles des échantillons 74, révèle déjà la présence prédominante de deux organismes du groupe *Thiobacillus thioparus* : un bâtonnet, Gram négatif, de 1,5 μ à 2,5 μ et un organisme ovale, Gram négatif, d'environ 1 μ . Les corps bactériens sont mélangés à des gouttes de soufre sphériques et à des cristaux.

Le repiquage de ces séries n'a pu être effectué que quatre mois plus tard, en milieu « 65 » saumâtre, employé couramment par la suite, puisqu'il était nettement démontré qu'il s'agissait d'espèces halophiles. Le résultat a été entièrement négatif. Nous n'en n'avons pas été très surpris, car les organismes du groupe *Thiobacillus thioparus* sont très délicats.

Cependant, lors des expériences faites en milieu de van Niel liquide [7], nous avons constaté, en l'absence des Rhodobactéries recherchées, que le sulfure de ce milieu était consommé, sans baisse de pH, d'ailleurs, ni production importante de soufre élémentaire.

Nous avons ainsi conservé, pendant plusieurs mois, des séries successives de cultures filles et la série des cultures brutes en milieu de van Niel, puis, en mars 1951, ces séries ont été additionnées d'une quantité appropriée de thiosulfate de sodium. Nous avons constaté une réponse plus ou moins rapide des divers échantillons, à l'exception du 53 (1). Au bout de vingt-quatre heures, le 86 se couvrait d'une pellicule de soufre et l'examen microscopique y révélait la présence du bâtonnet déjà observé, accompagné de gouttelettes et de cristaux de soufre. Pour les autres échantillons, l'activité ne s'est manifestée qu'au bout de trente jours environ, le 95 étant le plus actif.

Des repiquages ultérieurs en milieu « 65 » nous ont permis de vérifier qu'il s'agissait bien d'espèces du genre *Thiobacillus thioparus* des types observés au début.

Ces résultats montrent la présence de souches de l'espèce *Thiobacillus thioparus*, oxydant les thiosulfates, dans tous les échantillons qui nous ont été soumis, à l'exception du 53 (2).

L'activité oxydante a été particulièrement intense pour l'échantillon 86.

Deux souches ont été particulièrement mises en évidence. La première est une forme ovale d'environ $1\text{ }\mu$, Gram négative. La seconde est un bâtonnet, également Gram négatif, de 2 à $2,5\text{ }\mu$. Ce dernier se caractérise par sa grande résistance à la présence de H_2S , qui ne lui est pas spécifique, et par ce fait qu'il reste à l'état latent jusqu'à l'addition du métabolite spécifique, le thiosulfate, qui provoque sa pullulation.

Tous ces organismes sont halophiles facultatifs, sauf ceux trouvés dans l'échantillon 53 (1) qui semblent halophiles stricts.

OXYDANTS DU SOUFRE ÉLÉMENTAIRE. — Nous avons recherché, dans les échantillons étudiés, la présence de *Thiobacillus thioparus* (Waksman), connu jusqu'à présent comme l'agent principal de l'oxydation du soufre élémentaire en acide sulfurique. Nous avons utilisé la technique de Waksman [8], déjà employée par nous dans nos travaux antérieurs [9] ; elle consiste à ensemencer, dans des fioles d'Erlenmeyer, 100 cm^3 de milieu au soufre élémentaire, que nous appellerons milieu « 68 ». Le développement de l'organisme recherché se constate facilement : le pH du milieu, primitivement égal à 4,5-5,0, tombe brusquement à 3,0 et, bientôt, au voisinage de 1,0.

Comme pour les essais précédents, nous avons ensemencé deux séries parallèles : l'une dans l'eau douce, l'autre dans l'eau salée à 15 g de ClNa/l ; l'une et l'autre en milieu « 68 ». Au bout de quatorze jours, le pH de la culture 86 est tombé à 1,5. Pour les autres, il était voisin de 2,0. Le soufre était visiblement attaqué. Les cultures 53 étaient les

moins actives. Les cultures les plus actives étaient manifestement celles en milieu saumâtre, celle de 53 (1) étant la moins tolérante envers l'eau douce.

L'examen microscopique révélait la présence d'un très petit bâtonnet Gram positif, ayant un stade mobile, dans toutes les cultures, mais particulièrement prédominant dans la culture 86.

Toutes les cultures ont été repiquées, en milieu saumâtre, au bout de quatre mois. Les résultats obtenus étaient analogues à ceux de la série-mère.

Ces résultats prouvent la présence de *Thiobacillus thiooxydans* dans tous les échantillons étudiés, surtout dans les échantillons 86 et 95.

Il convient de souligner que tous ces organismes sont halophiles facultatifs, ce qui a été signalé par Saslawsky, cité par Zobell [43].

OXYDANTS DE L'HYDROGÈNE SULFURÉ. — Nous avons utilisé la méthode de van Niel [7] qui consiste à remplir du milieu approprié des flacons de 150 cm³ bouchés à l'émeri et scellés avec de la paraffine. Ce milieu, dûment ensemencé, était additionné de 15 g par litre de CINa, les expériences précédentes ayant montré qu'il s'agissait d'organismes halophiles. Les ensemencements, effectués le 4 octobre 1950, ont également été réalisés en tubes à essais contenant le même milieu avec bouchon de coton et de liège de manipulation plus facile.

Au bout de quinze jours, seuls le flacon et le tube correspondant à l'échantillon 53 (2) présentaient des pullulations rose pâle. Nous ne nous occuperons plus que de cette culture, la seule qui ait donné des Rhodothiobactéries.

L'examen de cette culture y a révélé la présence de plusieurs espèces de Thiorhodacées : *Lamprocystis*, formant une membrane sur la paroi éclairée du récipient, *Amoebobacter granula*, *Amoebobacter bacillus*, ainsi qu'une forme se rapprochant de *Rhabdochromatium*, mais dont les cellules sont plus arrondies et une espèce du genre *Chromatium*, petite, très mobile, qui n'a pas supporté les conditions de laboratoire (1).

Ces espèces sont nettement halophiles, fait déjà signalé par Gietzen [10].

Nous avons effectué de nombreux repiquages de vérification soit directs, soit après 4 et 5 dilutions. La durée de chaque essai était d'environ trente jours, avec vérification presque quotidienne du pH et de la présence de H₂S. Dans tous les cas, nous avons retrouvé, en plus ou moins grand nombre, les espèces observées au premier examen. Les trop grandes dilutions ne donnent pas de résultats très nets, les souches ont tendance à déperir. Ce sont celles qui donnent des pellicules ou des amas gélatinieux qui se prêtent le mieux au repiquage avec dilution en raison du caractère de leurs pullulations.

Ces observations montrent que l'échantillon 535 (2) contient un mélange de plusieurs espèces de Thiorhodacées, qui restent stables, à condition de les laisser en mélange en culture brute réalimentée à intervalles réguliers. Ces espèces sont halophiles.

(1) D'après des résultats exposés dans un autre travail, les espèces du genre *Chromatium* supportent mal les conditions de culture au laboratoire, même en culture brute, ayant besoin d'eau courante.

FLORE ASSOCIÉE. — Bien que ce soit sortir du sujet de cette communication, nous signalerons la présence, dans la flore microbienne de nos échantillons étudiée par l'un de nous, d'organismes connus pour leur rôle défini dans le cycle du soufre.

Parmi les aérobies hétérotrophes, nous avons trouvé, de façon constante et prédominante, des organismes du groupe *Bacillus subtilis*-*Bacillus mesentericus*, dont Guittonneau [11] signale qu'ils oxydent le soufre en thiosulfates.

Parmi les anaérobies producteurs d'hydrogène sulfuré, nous parlerons d'abord des réducteurs des sulfates. Des cultures effectuées sur place par J. Debyser, en milieu de van Delden, ont donné des résultats positifs. Des tubes de ces cultures nous ont été envoyés immédiatement par avion. Nous y avons observé des colonies du type *Vibrio desulfuricans* que nous avons pu cultiver dans le même milieu, mais qui n'ont pas survécu à un second repiquage. Dans les échantillons reçus en flacons, nous n'avons pu retrouver de façon certaine et cultiver, temporairement, ce type que dans les échantillons 53.

Nous n'avons pu mettre en évidence d'autres types de réducteurs de sulfates. En revanche, nous avons trouvé des réducteurs des sulfites caractéristiques, très actifs et persistants, dans les échantillons 74 et 86.

Enfin, des échantillons 53, 74 et 86, nous avons extrait des cultures purifiées de Clostridiales qui donnaient une abondante production de H_2S à partir du soufre organique (eau peptonée, par exemple).

Dans des échantillons de sédiments marins et lagunaires (même lagune), Callame [42] signale également des souches de Clostridiales sulfato-réductrices, sulfito-réductrices et désulfhydrylantes.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS. — L'étude de la flore autotrophe, oxydant le soufre et ses composés, de divers échantillons de sédiments de la lagune barrée d'Abidjan nous a conduits aux principaux résultats suivants :

1^o Les 7 échantillons étudiés renfermaient un organisme du genre *Thiobacillus thiooxydans*, aérobie, oxydant le soufre élémentaire en acide sulfurique.

2^o 6 échantillons sur 7 contenaient deux organismes appartenant au genre *Thiobacillus thioparus*, aérobie, oxydant le thiosulfate et déposant du soufre à l'extérieur des cellules.

3^o Ces organismes subsistent en présence d'hydrogène sulfuré qu'ils consomment sans abaissement de pH.

4^o Dans un seul des 7 échantillons nous avons observé 5 espèces appartenant aux *Thiorhodacées*, organismes anaérobies formant un pigment rouge, pouvant, grâce à l'énergie lumineuse, réduire l'hydrogène sulfuré avec dépôt de soufre à l'intérieur des cellules et, dans l'obscurité, oxyder ce soufre en sulfate par réduction du CO_2 emprunté au carbonate de sodium.

5^o Tous ces organismes sont plus ou moins *halophiles*. Nous rappelons que ce fait a déjà été signalé en ce qui concerne *Thiobacillus thioparus*, les *Thiorhodacées*, et *Thiobacillus thiooxydans*.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A.-R. PRÉVOT. *Ces Annales*, 1948, **74**, 157.
- [2] S. A. WAKSMAN. *J. Bact.*, 1922, **7**, 239 ; *J. Gen. Phys.*, 1923, **5**, 285 ; *Lab. Man. of Gen. Micr.*, New-York, 1928.
- [3] HÉLÈNE WINOGRADSKY et J. APPERT. *Ces Annales*, 1950, **78**, 365.
- [4] HÉLÈNE WINOGRADSKY et J. APPERT. *Loc. cit.*, 3, et HÉLÈNE WINOGRADSKY. *Ces Annales*, 1948, **75**, 577.
- [5] M. W. BEIJERINCK. *Centralblt. Bakt.*, II, 1904, **41**, 593.
- [6] H. J. BUNKER. *Dept. Sc. Ind. Research, Special Report*, 1936, n° 3.
- [7] C. B. VAN NIEL. *Arch. Mikr.*, 1931, **5**, 1.
- [8] S. A. WAKSMAN. *Loc. cit.*, 2.
- [9] HÉLÈNE WINOGRADSKY et J. APPERT. *Loc. cit.*, 3.
- [10] J. GIETZEN. *Centralblat. Bakt.*, II, 1931, **83**, 183.
- [11] G. GUITONNEAU. *C. R. Ac. Sci.*, 1925, **180**, 1142.
- [12] B.-CH. CALLAME. *Ces Annales*, 1951, **80**, 438.
- [13] CL. E. ZOBELL. *Marine Microbiology*, Chron, Bot. Co., Waltham, Mass. U. S. A., 1946.

**ACTION DE LA TERRAMYCINE
SUR LA FLORE INTESTINALE AÉROBIE
DU COBAYE ET DU CHAT**

par L. CARRÈRE et J. ROUX.

*(Travail du Laboratoire de Microbiologie.
Faculté de Médecine, Montpellier.)*

Les modifications apportées par les divers antibiotiques à la flore intestinale des malades sont plus ou moins importantes suivant l'antibiotique utilisé [2, 6, 7]. La terramycine, par son activité et l'étendue de son spectre bactérien, paraît avoir une action particulièrement intense [1, 3]. Dans cette note, nous apportons les premiers résultats d'une expérience en cours sur les modifications subies par la flore intestinale du cobaye et du chat.

I. Action chez le cobaye. — Un lot de 6 cobayes de 450 g environ est étudié pendant huit jours du point de vue flore intestinale aérobie, à raison d'un examen quotidien. A l'issue de cette période d'observation chaque cobaye reçoit 20 mg par jour de terramycine, en deux prises orales, au moyen d'une sonde. Chaque jour un examen de selle est pratiqué par ensemencement sur bouillon gélosé, lactosé, tourne-solé et identification des différentes colonies obtenues.

Le tableau suivant donne les résultats pour 10 examens. Chaque chiffre indique le nombre de fois où le germe a été décelé.

Nous constatons la disparition de *E. coli* et des coliformes dès le deuxième jour et leur réapparition, avec moins de fréquence au cinquième jour, la diminution du staphylocoque non pathogène et la

	AVANT terramycine	PENDANT TERRAMYCINE		
		2 ^e jour	5 ^e jour	10 ^e jour
<i>Escherichia coli</i> et coliformes.	7	0	4	4
<i>Streptococcus fecalis</i>	5	4	5	7
<i>Proteus</i>	0	0	5	10
Staphylocoque non pathogène.	10	5	5	2
Staphylocoque pathogène. . .	0	2	0	0

fréquence légèrement plus grande de *Streptococcus fecalis*. Au cinquième jour le *Proteus* apparaît et devient constant au dixième jour. L'apparition au deuxième jour d'un staphylocoque pathogène chez un cobaye a coïncidé avec la mort de celui-ci (cobaye I).

L'observation de chaque cobaye donne :

Cobaye I. Dès le deuxième jour, présence de staphylocoque doré pathogène, attaquant la mannite (milieu de Chapman), coagulase test positif, élaborant une entérotoxine mise en évidence par injection intraperitoneale au chat (Kitten test de Dolman et Wilson). Le cobaye meurt le deuxième jour. L'autopsie ne révèle aucune lésion macroscopique, pas de perte de poids, cultures du sang, de la rate et du foie négatives. Si la cause de la mort de l'animal n'est pas sûrement élucidée, l'action de la toxine staphylococcique est à envisager.

Cobaye II. Mort accidentelle le deuxième jour.

Cobaye III. Amaigrissement important dès le cinquième jour (diminution de poids de 12 p. 100). Quelques phénomènes diarrhéiques, appétit conservé. Arrêt de l'antibiotique au sixième jour. En quelques jours, ce cobaye reprendra son poids initial et survivra normalement.

Cobaye IV. Au cinquième jour, perte de poids de 10 p. 100, présence de *Proteus* dans les selles. Mort le sixième jour. A l'autopsie, cobaye très amaigri. Les cultures du sang, de la rate, du foie et de l'urine (prélevée dans la vessie) mettent en évidence pour tous les prélevements deux microbes : *Proteus mirabilis* et *Streptococcus fecalis*.

Cobaye V. Ce cobaye se cache à peu à peu. A partir du huitième jour, présence de *Proteus* dans les selles. Hérisse, en boule, il ne mange presque plus, meurt le dixième jour. A l'autopsie, cachexie considérable, perte de poids de 35 p. 100. Les cultures du sang, de la rate, du foie et des urines sont toutes négatives.

Cobaye VI. Ce cobaye présente au dixième jour le même aspect que le précédent ; nous supprimons alors l'administration de terramycine. Au quatorzième jour, la flore fécale est normale, mais persistance du *Proteus*. Le cobaye reste cachectique et meurt au dix-huitième jour. A l'autopsie, perte de poids de 40 p. 100. Les cultures du sang et de la rate mettent en évidence du *Proteus mirabilis*. Tous les germes isolés et testés à la terramycine se sont montrés résistants à plus de 500 µg.

En résumé, en administrant *per os* la terramycine à des cobayes, nous avons observé :

Une mort très rapide (deuxième jour), sans lésion organique macroscopique, d'un cobaye présentant dans ses selles un staphylocoque pathogène entérotoxique ;

Pour 4 cobayes, après quelques jours d'absorption de l'antibiotique, installation d'un état de dénutrition qui va jusqu'à la cachexie. Cet état coïncide avec l'apparition du *Proteus* dans les selles, il est réversible si on cesse la terramycine au cinquième jour ; il paraît irréversible si l'antibiotique est continué plus de dix jours. Dans deux cas, le *Proteus* est mis en évidence après la mort, dans le sang et dans divers organes ; dans un de ces cas, il était associé au *Streptococcus fecalis*.

Quelle signification pouvons-nous attacher à la présence de *Proteus*? Avant d'en discuter, considérons l'action de la terramycine sur le chat.

II. *Action sur le chat.* — Nous avons soumis un lot de trois jeunes chats de 1 mois à l'action de la terramycine (20 mg par jour en deux prises). Nous avons choisi cet animal, car sa flore intestinale et son régime alimentaire se rapprochent de ceux de l'homme. Par ailleurs, le jeune chat a une sensibilité particulière aux staphylocoques entérotoxiques. Avant l'administration de terramycine, la flore est composée essentiellement de *E. coli*, coliformes, *fecalis alcaligenes*, staphylocoque blanc non pathogène et entérocoque. Dès le deuxième jour du traitement les *coli*, coliformes et *fecalis alcaligenes* disparaissent. Seuls restent les cocci à Gram positif. Nous n'avons pas constaté l'apparition de *Proteus* ni de staphylocoque pathogène. Nous avons supprimé la terramycine chez un des animaux au cinquième jour : dès le lendemain la flore est revenue à sa composition primitive. Les deux autres animaux ont été traités pendant vingt-cinq jours : leur flore est restée composée uniquement de cocci Gram positifs, mais aucun trouble n'a été décelé dans le comportement de l'animal : croissance et poids sont restés identiques à ceux des animaux non traités.

La terramycine a donc chez le chat une influence sur la flore intestinale, mais la modification de celle-ci ne s'accompagne pas des troubles constatés chez le cobaye. La différence essentielle est la présence de *Proteus* chez le cobaye et son absence chez le chat.

Le *Proteus* n'est pas un hôte habituel « résident » du tube digestif du cobaye ; sans doute est-il un passager « transient » qui peut à la faveur d'un changement de conditions locales pulluler et même demeurer seul aérobiose de la flore intestinale. L'action inhibitrice de la terramycine sur les microbes intestinaux, son inaction relative sur le *Proteus* créent ces conditions.

Le *Proteus* a-t-il provoqué la mort par septicémie ? Nous avons décelé ce germe *post mortem* dans le sang et les organes dans la plupart des cas. Cette constatation est-elle suffisante (1) ?

Le *Proteus* a-t-il entraîné la mort en provoquant l'état cachectique ? Cet état coïncide avec l'apparition du *Proteus* dans les selles ; on

(1) RENOUX [4] ayant décelé le *Proteus*, par hémoculture et dans les fèces, chez les cobayes atteints de cachexie mortelle au cours du traitement de la brucellose expérimentale par l'auréomycine, admet son rôle efficient.

pourrait donc penser que, par son action protéolytique amenant une putréfaction importante empêché l'assimilation du fer ionisé et des acides aminés, notamment des acides aminés hématogènes, tryptophane et histidine, le *Proteus* est en cause.

Ne s'agit-il pas d'un épiphénomène, la disparition sous l'influence de la terramycine, de la flore intestinale normale créant une véritable avitaminose par défaut de synthèse bactérienne. Le *Proteus* aurait un rôle de « microbe de sortie », le *Streptococcus fecalis* jouant ce même rôle. Notons d'ailleurs que le rôle possible de ce dernier germe a déjà été signalé chez des malades traités par la streptomycine [5].

Quant à expliquer l'absence de troubles chez le chat, malgré les modifications de la flore intestinale, nous pouvons admettre un rôle du régime alimentaire et l'aptitude plus grande des diastases intestinales du chat à suppléer à la carence des enzymes microbiennes.

Nous essayons, dans des travaux en cours, de préciser ces divers points de vue.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. H. BAKER et E. J. PULASKI. *Ann. New York Acad. Sci.*, 1950, **53**, 324.
- [2] W. H. DEARING et F. R. HEILMAN. *Gastro-Enterology*, 1950, **16**, 12.
- [3] A. C. FINLAY et al. *Science*, 1950, **111**, 85.
- [4] REMOUX. Soc. Fr. de Microbiologie, 10 mai 1951, et Congrès de Palerme, 1951.
- [5] W. W. STEWARD et D. L. BALDRIDGE. *J. Am. med. Assoc.*, 1949, **159**, 579.
- [6] A. R. THOMAS et M. LEVINE. *J. Bact.*, 1945, **49**, 623.
- [7] H. WELCH, W. A. RANDALL et C. W. PRICE. *J. Am. Pharm. Assoc.*, 1950, **39**, 486.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA FLORE MICROBIENNE DES CARIÉS DENTAIRES

par J. BRISOU et G. MOUSTARDIER.

(*Clinique Stomatologique de la Faculté de Médecine
et Laboratoire de l'Ecole de Santé Navale, Bordeaux.*)

Notre intention n'est pas de faire une étude synthétique des différentes bactéries rencontrées dans les caries dentaires par les stomatologues et les bactériologues qui ont pu se livrer à maintes reprises à cette enquête.

Nous voulons simplement, à propos de prélèvements pulpaires effectués dans le service de stomatologie de la chaire d'Odonto-Stomatologie de la Faculté de Bordeaux (1), souligner quelques détails que nous suggère cette étude bactériologique.

(1) Nous remercions M. le professeur Dubecq de nous avoir permis la publication de ces résultats.

Les prélèvements faits par M. le Dr Duluc, Chef de Clinique, consistaient en émulsions pulpaires dans du sérum physiologique stérile (2 cm³ environ pour chaque échantillon). Ces mélanges étaient adressés au laboratoire immédiatement après le prélèvement. Les premiers ensemencements furent pratiqués sur gélose ordinaire et sur gélose au sang. Devant l'inconstance des résultats et surtout la fréquence des cultures négatives, il a paru préférable de recourir à des ensemencements en gélose Veillon selon la technique classique : tubes longs et de faible calibre.

Grâce à cette méthode, on pouvait plus fréquemment isoler une ou deux espèces microbiennes à partir des émulsions ensemencées. De l'ensemencement de ces cultures, il est possible de tirer les enseignements suivants :

Les 15 pulpes cultivées ont fourni 11 résultats positifs, soit 71,5 p. 100.

Deacon et Schwartz, en 1935 [1], après une enquête portant sur des prélèvements effectués au laboratoire sur des dents extraites et sciées à l'apex, ont obtenu 85,2 p. 100 de cultures positives. Le fait que nos ensemencements avaient pour point de départ des émulsions pulpaires pratiquées *in situ*, permet d'expliquer la différence des pourcentages positifs.

La flore microbienne était relativement pauvre et d'aspect monotone. Elle se répartissait ainsi :

<i>Streptococcus fecalis</i>	3 fois.
<i>Streptococcus mitis</i>	3 —
<i>Lactobacillus odontolyticus</i>	4 —
Coliforme	1 —
<i>Corynebacterium</i> (hémophile)	1 —

Le *Lactobacillus* accompagnait deux fois un *Streptococcus mitis*. Le coliforme fut rencontré en association avec un *Streptococcus fecalis*.

Il n'a jamais été isolé de spirilles, de *Fusiformis* ou de bactéries de la putréfaction.

Ces résultats s'accordent tout à fait avec ceux de Deacon et Schwartz [1]. Il faut noter l'absence de streptocoques hémolytiques, fait déjà souligné par plusieurs auteurs et l'un de nous [2] lors d'une étude poursuivie sur l'hémoculture gingivale dans la pyorrhée alvéolo-dentaire. Selbie et ses collaborateurs [3] ont également attiré l'attention sur cette particularité lors de recherches effectuées sur la flore microbienne comparée de l'endocardite maligne, du rhinopharynx et des dents.

La flore dominante, et quasi constante, est à base de streptocoques non hémolytiques du groupe D (*St. fecalis*) ou du type *salivarius-mitis*.

Le *Corynebacterium* isolé, une seule fois du reste, répondait aux caractères de *Corynebacterium endocarditis* décrit par Diaz et Arjona [4] et que l'un de nous a pu retrouver dans des hémocultures de sujets atteints d'endocardites subaiguës (en collaboration avec Ch. Berge [5]). Il résulte donc de ces résultats et des travaux d'autres auteurs que, quels que soient le procédé et le mode de prélèvement (dents extraites, hémoculture gingivale, lavage de pulpe

vivante) les conclusions sont superposables. La flore de la dent cariée est pauvre ; elle offre surtout des streptocoques non hémolytiques avec de temps à autre quelques espèces aberrantes.

Les ensemencements pratiqués en gélose profonde donnent des résultats plus constants que les cultures aérobies.

Ces cultures ne sont jamais abondantes ; deux tubes de gélose Veillon par centimètre cube d'émulsion de pulpe suffisent à l'obtention de colonies faciles à séparer. Il est bon de laisser les cultures se développer pendant au moins quarante-huit à soixante-douze heures. Dans certains cas, l'apparition de colonies n'a lieu que vers le quatrième ou cinquième jour.

BIBLIOGRAPHIE

- [4] DEACON et SCHWARTZ. *Dental Comos*, décembre 1935, 1163.
- [2] G. MOUSTADIER. *Rev. d'Odontol.-Stomatol.*, Bordeaux, 1951, 9, 10.
- [3] F. R. SELBIE, R. D. SIMON et R. H. M. ROBINSON. *Brit. med. J.*, 1949, 1, 667.
- [4] J. DIAZ et E. ARJONA. *Bull. Inst. J. Med. Rec.*, Madrid, 1949, 2, 7.
- [5] Ch. BERGE et J. BRISOU. *Ces Annales* (sous presse).

INFLUENCE DE LA SECRÉTION THYROÏDIENNE SUR LA CROISSANCE DES TUMEURS

II. — ACTION DE LA THYROIDECTOMIE SUR LA CROISSANCE DU CANCER EXPÉRIMENTAL GREFFÉ DU RAT BLANC (SOUCHE T DE GUÉRIN).

par M. DARGENT, J. VIALLIER et E. GUINET.

(*Laboratoire de Médecine Expérimentale* [professeur JOSSEURAND]
et *Centre Anticancéreux de Lyon* [professeur SANTY].)

Nous avons étudié, de février 1948 à février 1951, les effets de la thyroïdectomie sur la croissance de la tumeur T. 8 de Guérin (adéno-carcinome utérin) chez le rat blanc. Seize séries d'expériences ont été faites.

La thyroïdectomie a été pratiquée chirurgicalement sous anesthésie générale à l'éther, par incision transversale du cou et dissection de bas en haut du nerf récurrent dans son trajet intraglandulaire, après section franche des muscles médians et écartement des glandes sous-maxillaires. L'exérèse du parenchyme a été faite par dissociation des adhérences naturelles du plan trachéo-oesophagien, et l'hémostase par compression temporaire (1).

(1) Nous tenons à remercier M. le professeur Hermann qui a mis le Laboratoire de Physiologie à notre disposition, pour réaliser cette intervention.

Chaque série comportait 5 animaux (soit en tout 80) ; 50 ont pu être conservés ; la mortalité opératoire ou post-opératoire a donc été de 37,5 p. 100 ; elle est due à des accidents d'anesthésie, à des hémorragies, à des accidents de dyspnée précoce entraînée par la paralysie récurrentielle, à la tétanie du deuxième au sixième jour. Les animaux étaient âgés de 4 mois et appartenaient à une souche contrôlée (souche de Commentry), *indemne de cancers spontanés*. Le régime était constitué de pain et de pommes de terre.

La greffe a été faite au trocart, sous la peau du dos, dans des délais variables après la thyroïdectomie ; nous les préciserons plus loin.

Les animaux ont tous été sacrifiés dès qu'une tumeur menaçait de s'ulcérer à la peau, de manière à éviter les erreurs dues à la surinfection. En général, l'autopsie a été faite au vingt-cinquième jour. Une série a été sacrifiée au vingt-huitième, une autre au quinzième jour.

À part 3 qui ont vécu isolés, tous ont été placés dans des cages contenant de 3 à 5 rats.

Les observations de chaque série d'animaux thyroïdectomisés ont été soumises à la comparaison avec celles d'une série d'animaux témoins soumis aux mêmes conditions de régime et d'environnement. Les résultats nous ont semblé varier en fonction du sexe des animaux et des délais entre la thyroïdectomie et la greffe.

Sur les 104 animaux observés (50 thyroïdectomisés, 54 témoins ayant parfois servi de contrôle à deux séries d'opérés), nous avons établi deux grandes catégories d'expérience :

1^o 24 ont été greffés de *six à dix jours au plus* après la thyroïdectomie.

2^o 28 ont été greffés de *treize à vingt-huit jours au plus* après la thyroïdectomie.

1^o ÉTUDE DES EFFETS DE LA THYROÏDECTOMIE SUR LA GREFFE PRÉCOCE. — 18 femelles et 6 mâles ont été opérés et suivis.

Les résultats ont été très variables. Sur 5 séries de femelles, on observe les modifications suivantes de poids des tumeurs :

SÉRIE	FEMELLES OPÉRÉES			FEMELLES TÉMOINS		
	Nombre d'animaux	Nombre de pesées	Poids moyen en g	Nombre d'animaux	Nombre de pesées	Poids moyen en g
I . . .	5	5	10	5	5	9
II . . .	2	2	9	2	2	2
III . . .	3	3	17,5	4	3	13,8
IV . . .	3	3	3	4	4	12,7
V . . .	5	5	2	5	5	17

On peut ajouter à ces résultats disparates, les remarques suivantes : *Dans les trois premières séries où la croissance des tumeurs a été*

bien plus importante, les animaux opérés et les témoins avaient gardé strictement leur poids ou avaient augmenté de 4 à 5 p. 100 de leur poids de départ ;

Dans les deux dernières, alors que les témoins avaient engrassé également de 6 p. 100, les opérés avaient perdu 23 p. 100 de leur poids initial.

D'autre part, ces deux séries ont été faites l'hiver (décembre 1950, février 1951) : les animaux ont séjourné au moins deux jours par semaine dans un laboratoire où la température était de 6°. Les thyroïdectomisés ont donc été soumis à l'action du froid. Ils présentaient des signes de cachexie, perdaient leur poids et restreignaient leur alimentation.

Sur les trois séries de mâles, on observe les modifications suivantes :

Dans ces séries, les modifications du poids des animaux ont été insignifiantes ; dans l'ensemble, les opérés avaient maigri de 4 à 5 p. 100 de leur poids initial.

SÉRIE	MALES OPÉRÉS			MALES TÉMOINS		
	Nombre d'animaux	Nombre de pesées	Poids moyen en g	Nombre d'animaux	Nombre de pesées	Poids moyen en g
I . . .	1	1	6	3	3	17,4
II . . .	2	2	4,6	5	5	14,8
III . . .	3	3	10	3	2	9

Nous avons comparé la tendance aux métastases de ces tumeurs dans les deux catégories d'animaux.

Chez les femelles, on trouve un nombre strictement égal de métastases ganglionnaires ou inguinales, chez les opérées et les témoins (3 cas).

Chez les mâles, on observe chez un seul opéré, sacrifié au trente-huitième jour, une très grande quantité de métastases : surrénales, mésentériques, pulmonaires et ganglionnaires.

2^e ETUDE DES EFFETS DE LA THYROÏDECTOMIE SUR LA GREFFE TARDIVE. —

17 femelles et 9 mâles ont été opérés et suivis.

Les résultats ont été beaucoup plus constants que dans la première série. Sur 5 séries de femelles, on observe les modifications suivantes du poids des tumeurs.

Dans 3 séries, il n'y a pas eu de modification du poids des animaux ; dans 2, le poids a augmenté de 8 p. 100. Si tous maigrissaient dans la semaine qui suivait l'intervention, ils récupéraient pratiquement tous leurs poids. Le froid ne semble pas avoir exercé d'influence notable.

Sur les 3 séries de mâles, on observe les modifications suivantes : Il n'y a eu aucune modification appréciable du poids des animaux. Dans les deux dernières séries d'expérience autant pour les effets

SÉRIE	FEMELLES OPÉRÉES			FEMELLES TÉMOINS		
	Nombre d'animaux	Nombre de pesées	Poids moyen en g	Nombre d'animaux	Nombre de pesées	Poids moyen en g
I . . .	1	1	7	4	3	13,8
II . . .	3	3	11,6	3	3	16,6
III . . .	4	4	16,5	4	4	17
IV . . .	5	5	4,2	5	5	15
V . . .	4	4	7	5	5	17

de la greffe précoce que de la greffe tardive, nous avons contrôlé l'hypophyse et les surrénales. Dans toutes, nous avons vérifié l'état du conduit trachéo-œsophagien à l'autopsie.

SÉRIE	MALES OPÉRÉS			FEMELLES OPÉRÉES		
	Nombre d'animaux	Nombre de pesées	Poids moyen en g	Nombre d'animaux	Nombre de pesées	Poids moyen en g
I . . .	1	1	10	3	3	6
II . . .	4	4	9	4	4	7
III . . .	4	4	7,5	4	4	3

Macroscopiquement, dans tous les cas, il a été possible de retrouver des *fragments de corps thyroïde au contact de l'œsophage* ou dans l'angle trachéo-œsophagien.

En conséquence, nous pensons que ce sont donc pratiquement *toujours des thyroïdectomies subtotalles qui ont été pratiquées*. La survie sans signe de tétanie est certainement une autre preuve expérimentale de ce fait.

L'examen histologique au sixième jour montre, dans un cas, un fragment thyroïdien très altéré ; dans un autre, au sein d'un amas scléreux, un fragment de parenchyme à cellules cubiques avec colloïde rare et vacuolisé.

L'examen histologique au dix-septième jour montre dans les fragments des signes d'hyperplasie très nette.

Les corps thyroïdes des animaux témoins étaient tous normaux.

L'examen macroscopique des hypophyses chez les animaux greffés précocelement montre des différences insignifiantes : 4,60 mg pour les thyroïdectomisés contre 4,50 mg chez les témoins.

Par contre, les différences sont beaucoup plus sensibles chez les animaux greffés tardivement : 6 mg pour les opérés, contre 4,5 mg chez les témoins. Les altérations histologiques nous ont paru ininterprétables.

Enfin, l'examen des surrénales montre peu de modifications : elles

pèsent 19,50 mg chez les témoins et 19,65 mg chez les animaux greffés précocement, contre 18,3 mg chez les animaux greffés tardivement.

Chez les animaux greffés précocement, la glomérulée est mal visible et il y a hyperplasie de la fasciculée. Chez les animaux greffés tardivement chez qui les glandes sont congestionnées et cédémateuses, d'aspect macroscopiquement hémorragique, deux fois sur trois, il y a prédominance de la couche spongiocyttaire.

En conclusion, il semble que la thyroïdectomie « chirurgicale », c'est-à-dire anatomiquement incomplète, entraîne des modifications de la croissance d'une tumeur greffée, surtout manifestes lorsque la greffe est faite dix jours après l'intervention.

La tumeur T. 8 de Guérin semble freinée dans son évolution, chez la femelle. Il faut sans doute considérer cet effet comme le résultat d'une réaction fonctionnelle hypophysaire à effet thyréotrope et peut-être gonadotrope, les effets chez le mâle semblant différents.

RECHERCHES SUR LE VENIN DE *VIPERA URGINII*

par R. DUGUY.

(Laboratoire du Muséum d'Histoire Naturelle, Nantes.)

Deux *Vipera ursinii*, capturées sur les pentes nord du mont Ventoux (Vaucluse), nous ont permis de faire une courte expérience sur la toxicité de leur venin. Nos essais ont été limités à des épreuves de toxicité sur la souris blanche. Le venin de *V. ursinii* est incolore, blanc lorsqu'il est desséché. Comme celui de *V. aspis*, il se dissout facilement dans l'eau.

Toutes les solutions que nous avons utilisées étaient fraîchement préparées à raison de 2 mg du produit sec par centimètre cube d'eau physiologique.

Voici les résultats obtenus.

Mesure de la toxicité du venin de *V. ursinii* sur la souris de 15 g environ.

NUMÉRO des souris	DOSES DE VENIN injectées en mg	VOIE de l'injection	RÉSULTATS
1	0,05	Sous-cutanée.	Survit.
2	0,10	Sous-cutanée.	Survit.
3	0,20	Sous-cutanée.	Survit.
4	0,35	Sous-cutanée.	Survit,
5	0,40	Sous-cutanée.	Morte en 14 heures.
6	0,45	Intra-péritonéale.	Survit.
7	0,30	Intra-péritonéale.	Morte en 4 h. 30.
8	0,05	Intra-veineuse.	Survit.
9	0,10	Intra-veineuse.	Survit.
10	0,15	Intra-veineuse.	Survit.

La dose toxique pour la souris est voisine de 0,40 mg lorsque le poison est introduit sous la peau. Notre provision de venin étant épuisée, il ne nous a pas été possible de déterminer exactement la dose mortelle par voie veineuse. Néanmoins il ressort de cette expérience, qu'elle est supérieure à 0,15 mg, dose à laquelle le venin de *Vipera aspis*, dans les mêmes conditions, tue très rapidement.

Si on compare en effet les résultats des différents expérimentateurs, on constate que le venin de *V. ursinii* est moins toxique que celui de *V. aspis*. Introduit sous la peau de la souris, il est quatre fois moins toxique :

**Doses minima mortelles de *V. aspis* et de *V. ursinii*
administrées sous la peau de la souris.**

<i>V. aspis</i>	0,14 mg soit 41,6 mg/kg (M. Phisalix).
	0,05 mg soit 2 mg/kg (P. Boquet).
<i>V. ursinii</i>	0,10 mg soit 9 mg/kg (R. Duguy).
	0,40 mg soit 28 mg/kg (R. Duguy).

L'examen des souris mortes nous a permis d'étudier les lésions anatomo-pathologiques de l'envenimation.

A l'autopsie on observe :

Dans la peau, au point d'injection, un œdème hémorragique qui diffuse vers les tissus voisins.

Sur le péritoine et l'intestin, des foyers congestifs et hémorragiques. Parfois des suffusions hémorragiques sur la tunique externe de l'intestin grêle, plus rarement sur l'estomac.

Dans le rein, on remarque dans quelques cas des petites taches hémorragiques dans le tissu rénal et une dilatation des vaisseaux du hile de l'organe, mais souvent le rein conserve son aspect normal.

Dans la rate et dans le foie, une réaction congestive.

Dans le poumon, des hémorragies, parfois des petits infarctus, rarement la congestion d'un lobe entier.

Dans le médiastin, une augmentation du volume des vaisseaux, qui sont gorgés d'un sang noirâtre et parfois une dilatation des vaisseaux coronaire.

Voici d'autre part les résultats des examens histo-pathologiques de fragments de tissus prélevés sur les viscères :

Tube digestif : épanchements hémorragiques dans les séreuses de l'intestin et l'épiploon dont les vaisseaux sont dilatés et les capillaires rompus.

Reins : dilatation des vaisseaux du parenchyme, hémorragies des capillaires, altération des tubes collecteurs et des tubes contournés, rupture, par places, de l'épithélium et lésions de néphrite épithéliale.

Rate : nombreux foyers hémorragiques.

Foie : congestion surtout périportale, augmentation du diamètre des capillaires ; quelques cellules du parenchyme sont vacuolaires.

Poumon : épaissement des parois des alvéoles, quelques foyers de congestion œdémateuse.

En résumé, *Vipera ursinii* capturée en France secrète un venin incolore, hémorragipare, moins toxique que celui de la pélade ou de l'aspic. Les lésions anatomo-pathologiques des animaux qui ont

succombé à une injection de ce venin sont comparables à celles des animaux intoxiqués par *V. aspis* et *V. berus*, en particulier celles du poumon, du foie, du rein (L. Vaillant-Hovius [1]) et du tube digestif (P. Boquet et A. Delaunay [2]).

En raison de l'épuisement de notre provision de venin, il ne nous a pas été possible d'expérimenter *in vitro*. Nous espérons que de nouvelles récoltes permettront d'entreprendre des recherches sur les propriétés enzymatiques de ce poison, en particulier de préciser si le venin de *V. ursinii* contient une *l*-amino-oxydase comparable à celle du venin jaune de *V. aspis*, ou s'il se comporte comme le venin incolore des aspics du Gers, qui est dépourvu de la propriété d'attaquer la leucine.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] L. VAILLANT-HOVIUS. *Thèse de Bordeaux*, 1902.
- [2] P. BOQUET. *Venins de serpents et antivenins*, 1 vol. Ed. médicales Flammarion, Paris, 1948.
- [3] E. A. ZELLER. *Advances in enzymology*, 1948, VIII, 459.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Sur les conditions écologiques et les conditions de laboratoire. Étude comparée, illustrée par quelques observations sur les Thiorhodacées, par M^{me} H. WINOGRADSKY.

Action du venin de « Vipera aspis » sur les fibroblastes d'embryons de poulet cultivés « in vitro », par E. LASFARGUES et J. DI FINE LASFARGUES.

Application de la recherche des bactériophages à l'étude des eaux polluées, par A. GUELIN et J. GOZDAWA-LE BRIS.

Recherches sur les facteurs qui conditionnent l'appartenance des bacilles paratyphiques B aux différents types de Felix et Callow. III. Nouvelles études sur les transformations de types par l'action des bactériophages extraits des bacilles lysogènes, par P. NICOLLE et Y. HAMON.

Contribution à l'étude des réactions d'hémagglutination et d'hémolyse conditionnée dans la tuberculose, par L. LUCENTINI et H. BOISVERT.

Cultures jeunes de bacilles tuberculeux et éléments filtrables de ces germes, par L. NÈGRE et J. BRETEY.

Infection tuberculeuse abortive du cobaye déterminée par l'inoculation d'une ou quelques unités de bacilles tuberculeux jeunes ou de produits pathologiques humains prélevés chez des sujets infectés de tuberculose ou atteints de cette maladie, par L. NÈGRE et J. BRETEY.

Le déterminisme de la sporulation du « *Bacillus megatherium* ». II. Effets de la pénurie du nitrate et des autres constituants minéraux du milieu synthétique, par N. GRELET.

Observations préliminaires sur le phénomène de « conglutination induite », par O. BIER.

Etude de la toxine R2 du *B. typhique*, par M. DIGEON, M. RAYNAUD et A. TURPIN.

Purification de la toxine et de l'anatoxine téstaniques, par A. TURPIN, M. RAYNAUD et M. ROUYER.

ÉLECTIONS

MM. A. Castellani, Duchon et M^{le} F. Tanner ont été élus membres de la Société Française de Microbiologie.

LIVRE REÇU

H. Stanley Banks. — *The Common Infectious Diseases*, Edward Arnold and C^o., London 1949, 354 pages, 22×14,5 cm., prix : 21 sh.

L'auteur qui enseigne les maladies infectieuses au Medical College de l'Hôpital St. Bartholomew à Londres, présente dans un ouvrage destiné aux étudiants et aux praticiens, la symptomatologie, le diagnostic et le traitement des maladies infectieuses les plus communes. On y trouve successivement toutes les maladies de l'enfance, depuis la diphtérie jusqu'à la varicelle, très heureusement suivies de l'étude de la vaccine et de la variole, puis les autres maladies infectieuses : méningococcie, poliomyélite, typhoïde, etc. L'ouvrage se termine par une étude des diarrhées infantiles. Clair et bien illustré, le livre répond pleinement au but qu'il s'est proposé.

P. L.

Le Gérant : G. MASSON.